

Tesis de Posgrado

Incorporación de L-Leucina en Saccharomyces Cerevisiae : Sistemas transportadores en células enteras y protoplastos

Kotliar, Natalio

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kotliar, Natalio. (1986). Incorporación de L-Leucina en Saccharomyces Cerevisiae : Sistemas transportadores en células enteras y protoplastos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1951_Kotliar.pdf

Cita tipo Chicago:

Kotliar, Natalio. "Incorporación de L-Leucina en Saccharomyces Cerevisiae : Sistemas transportadores en células enteras y protoplastos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1951_Kotliar.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INCORPORACION DE L-LEUCINA EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE.
SISTEMAS TRANSPORTADORES EN CELULAS ENTERAS Y PROTOPLASTOS.

NATALIO KOTLIAR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. EUGENIA H. RAMOS

LUGAR DE TRABAJO: CATEDRA DE QUIMICA BIOLOGICA.
FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1986

-Tesis 1951
y 2

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Eugenia H. Ramos por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, y quien con su orientación y oportunos consejos hizo posible la realización de esta tesis.

Al Dr. James R. Mattoon cuya influencia resultó decisiva para mi desarrollo en la actividad científica.

A la Dra. Lucía C. de Bongioanni por su permanente estímulo y colaboración.

A la Sra. Irene B. de López por su incondicional asistencia técnica.

A Isabel Burgos por su apoyo técnico y su indispensable participación en la realización de este manuscrito.

A mis compañeros de laboratorio y a todos aquellos que durante estos años estuvieron a mi lado brindándome su apoyo, tanto en el plano científico como personal.

A mis padres

A Debbie

A Alejandra

Los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados parcialmente en:

Systems of L-leucine transport into Saccharomyces cerevisiae protoplasts.

Kotliar, N. y Ramos, E.H. Biochim.Biophys.Acta. 734, 378-380. 1983.

Relationship between ΔpH and L-leucine transport in S.cerevisiae.

Kotliar, N. y Ramos, E.H. En redacción

ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina.
AMP _c	3',5' monofosfato de adenosina.
ATP	trifosfato de adenosina.
ATPasa	adenosina trifosfatasa.
$\Delta \mu_{H^+}$	gradiente de potencial electroquímico de protones.
ΔpH	gradiente de pH.
$\Delta \psi$	gradiente de potencial eléctrico.
DNP	2,4-dinitrofenol.
DTT	ditiotreitol.
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
FHK	ftalato ácido de potasio.
FMA	ácido fluoresceínmercuriacético.
GSMAL I	glutación maleimida I.
J_{M_i}	velocidad máxima de translocación del sistemas S_i .
K_{T_i}	concentración de L-leucina necesaria para alcanzar. la mitad de la velocidad máxima en el sistema S_i .
K_{d_i}	constante de disociación del ligado del sistema S_i .
N_i	concentración de sitios de unión del sistema S_i .
NEM	N-etilmaleimida.
NFM	N-fenilmaleimida.

INDICE

INTRODUCCION

1.1. Levaduras <u>Saccharomyces</u> sp, de los más pequeños, antiguos y fieles servidores del hombre.	1
1.2. Las membranas cumplen diversas funciones vitales en la fisiología celular.	3
1.3. El estudio de la incorporación de nutrientes en microorganismos permitió un avance importante en el conocimiento del proceso de transporte.	8
1.4. En bacterias los nutrientes utilizan múltiples sistemas de transporte específicos.	9
1.4.1. Sistema de la fosfotransferasa.	10
1.4.2. Sistemas mediados por proteínas de ligado.	11
1.4.3. Sistemas acoplados a gradientes iónicos.	13
1.4.4. Otros sistemas.	15
1.5. En las levaduras los nutrientes utilizan sistemas de transporte específicos y generales.	16
1.6. Numerosos interrogantes subsisten en el conocimiento de los procesos de transporte de nutrientes en levaduras.	24
1.7. Objetivos.	27

MATERIALES Y METODOS

2.1. Levaduras.	29
2.2. Mantenimiento de las cepas de levadura.	29
2.3. Condiciones de crecimiento.	29
2.4. Curvas de crecimiento.	30
2.5. Suspensión de trabajo. Correlación entre número de células y peso seco.	32
2.6. Técnica de incubación.	33
2.7. Preparación de protoplastos.	33
2.8. Coloración de PAS.	34
2.9. Coloración vital.	35
2.10. Determinación de L- ¹⁴ C leucina intracelular.	35

2.10.1. Células enteras.	35
2.10.2. Protoplastos.	35
2.11. Determinación de la radiactividad de las muestras.	36
2.11.1. Células enteras.	36
2.11.2. Protoplastos.	36
2.12. Medidas de consumo de oxígeno.	37
2.13. Determinación de agua intracelular.	37
2.14. Determinación de la incorporación de ácidos débiles, pH intracelular y Δ pH.	38
2.15. Diseño experimental.	39
2.16. Origen y calidad de las drogas utilizadas.	41

RESULTADOS

3. Propiedades del proceso de incorporación en células enteras.	42
3.1. Las levaduras <u>S.cerevisiae</u> cepas JB65 y JB64 incorporan L-leucina.	43
3.2. El consumo de D-glucosa y etanol estimulan la incorporación de L-leucina.	44
3.3. En levaduras con alta carga energética la incorporación es mayor que en levaduras con baja carga energética.	47
3.4. Las células con alta carga energética responden a la presencia de sustratos oxidables en el medio de reacción.	50
3.5. El 2,4-dinitrofenol inhibe la incorporación de aminoácidos.	52
4. Propiedades del proceso de entrada en células enteras.	55
4.1. La medida de la incorporación, a tiempos cortos, es la medida del proceso de entrada.	55
4.2. El estudio cinético de la translocación señala la existencia de dos sistemas.	59
4.3. La L-leucina se une a sitios de la barrera de permeabilidad para ser translocada.	63

5. Propiedades del proceso de incorporación en protoplastos.	69
5.1. Los protoplastos son células de levaduras viables desprovistos de pared celular y consecuentemente del espacio periplasmático.	69
5.2. Los protoplastos incorporan L-leucina en función del tiempo.	71
5.3. La incorporación a tiempos cortos es la medida de la entrada. Se distinguen una etapa de ligado y otra de translocación.	73
5.4. El estudio cinético de la translocación en protoplastos señala la existencia de dos sistemas.	73
5.5. La L-leucina se une a sitios de la membrana plasmática para ser translocada.	75
5.6. La incorporación de L-leucina en protoplastos es sensible al pH extracelular.	82
5.7. Comparación entre células enteras y protoplastos.	82
6. Los reactivos de grupos tioles permiten investigar la localización de los sistemas de transporte.	86
6.1. La entrada de L-leucina es sensible a N-etilmaleimida, sus efectos no resultan modificados por el ditiotreitól.	87
6.1.1. Ensayos en protoplastos.	87
6.1.2. Ensayos en células enteras.	92
6.2. La N-fenilmaleimida también es capaz de modificar la entrada de L-leucina.	92
6.2.1. Ensayos en protoplastos.	95
6.2.2. Ensayos en células enteras.	95
6.3. Los grupos sensibles a las maleimidas no se hallan orientados hacia la superficie externa de la célula.	98
6.4. El ácido fluoresceínmercuriacético afecta principalmente el ligado de L-leucina por el sistema S ₂ .	99
6.5. Los reactivos de grupos tioles son capaces de inhibir la respiración celular.	102

7. Participación del potencial de membrana.	105
7.1. ¿Qué relación existe entre el gradiente electroquímico y el transporte de nutrientes en levadura?	105
7.2. La difusión de un ácido débil al interior de la célula permite estimar el gradiente de pH.	106
7.3. La energización de las células con D-glucosa se tradujo en un aumento del pH intracelular.	109
7.4. En células silvestres el etanol es capaz de generar un aumento del pH intracelular.	114
7.5. La cepa mutante JB64 se distingue de la silvestre JB65 al estudiar el consumo de etanol.	119
7.6. El 2,4-dinitrofenol y la N-etilmaleimida colapsan el gradiente de protones.	121
DISCUSION.	123
CONCLUSIONES.	147
RESUMEN.	151
REFERENCIAS.	

INTRODUCCION

1.1. Levaduras Saccharomyces sp, de los más pequeños, antiguos y fieles servidores del hombre.

Las levaduras conforman un grupo de microorganismos que ha estado íntimamente asociado al progreso y bienestar del hombre. Su contribución reside en la habilidad que poseen algunas de ellas, de realizar una rápida y eficiente transformación de azúcares en alcohol y dióxido de carbono.

Este aporte, vastamente documentado, se remonta hasta los albores de la civilización, llegando incluso hasta la XXI dinastía de Tebas (2000 a J.C) donde, en excavaciones arqueológicas, se hallaron claros indicios del desarrollo de actividades de panificación y de fermentación de bebidas. La observación microscópica de sedimentos contenidos en urnas funerarias destinadas a bebidas, revelaron en distintas tumbas, la existencia de lo que parecerían ser, casi con seguridad, células de levaduras (Winlock, 1920).

Estos hallazgos fueron los comienzos de la intensa actividad industrial que se desarrolló hasta nuestros días y que incluye la cervecera, la vinera, la panificación y más recientemente la obtención de etanol con fines energéticos.

Otro importante aporte de las levaduras al progreso de la humanidad, lo constituye su utilización, como organismo, para investigar los procesos bioquímicos y metabólicos básicos, en las células vivas, dada su disponibilidad como producto proveniente de la actividad industrial.

Se atribuye al holandés Leewenhoek el haber sido el primero en observar las levaduras al microscopio, quien en 1650 envió sus descripciones y dibujos a la Real Sociedad de Londres.

No fue sino hasta la primer mitad del siglo XIX, que

se realizaron significativos progresos en el esclarecimiento de la biología de las levaduras. A pesar de que, en 1827 Hennell fue capaz de producir químicamente alcohol a partir de azúcar, ya que en esa época este proceso no era considerado como biológico, y las levaduras, invariablemente asociadas a la mezcla de fermentación, eran consideradas como material inerte.

En 1837 Cagniard-Latour demostró que las levaduras de cerveza eran cuerpos esféricos y pequeños, capaces de multiplicarse por gemación y llevar a cabo el proceso de fermentación y las incluyó en el reino vegetal. Kützing y Schwan apoyaron esta idea y las denominaron "Zuckerpilz" (hongo del azúcar) de donde proviene el nombre Saccharomycetes.

Esta idea celular o vitalística planteó serias contradicciones en la comunidad científica, dando lugar, en 1838, a la aparición en los Anales de Liebig, de un artículo en el que se describía a la levadura como un animal diminuto, su forma se asemejaba a la de un aparato de destilación y era capaz de consumir azúcar y excretar el "espíritu del vino", mientras que el dióxido de carbono era incluido en una vesícula en forma de botella de champña. El propio Liebig, al igual que Wholer y Berzelius, estaba convencido de que las levaduras eran una sustancia química inestable, "fermento", que transmitía su inestabilidad al azúcar, la que se descomponía en alcohol y dióxido de carbono.

La concepción vitalística del proceso comenzó a ganar aceptación a partir de los trabajos de Pasteur, que demostraron la verdadera naturaleza de la fermentación, 1854-1864. Debido a sus fracasos en conseguir extractos libres de células, capaces de transformar azúcar en alcohol y

dióxido de carbono, Pasteur murió en 1895 convencido de que la fermentación sin células vivas resultaba imposible. Un extracto con esas características fue obtenido por los hermanos Buchner en 1897, resultado frecuentemente mencionado como el nacimiento de la bioquímica moderna.

La posterior simplificación del proceso de obtención de extractos celulares convirtió a las levaduras en un material ampliamente utilizado en investigación. Estos permitieron a Neuberg en 1912 proponer un esquema glucolítico, verificado más tarde por el mismo Neuberg y por Warburg en levaduras, luego de los trabajos de Meyerhoff y Embden en 1934 en músculo esquelético.

También en levaduras se hicieron importantes descubrimientos en el conocimiento del proceso respiratorio, Keilin 1925, y su relación con el catabolismo oxidativo, Warburg, 1928, 1935, 1938, así como el descubrimiento del acetyl CoA y la descripción del proceso de oxidación de los ácido grasos, Lynen 1952. Resultados a los que se debe añadir el descubrimiento del ATP en 1929 en forma independiente por Fiske-Subarow y Lohmann-Schuster.

Actualmente las levaduras continúan siendo uno de los organismos más utilizados para la investigación en las distintas áreas de la biología y la bioquímica, y son considerados como modelos celulares muy apropiados para investigar los mecanismos y el papel fisiológico del transporte de nutrientes a través de las membranas celulares.

1.2. Las membranas cumplen diversas funciones vitales en la fisiología celular.

Se han presentado numerosas evidencias que demuestran el papel fundamental de las membranas en la organización de

los seres vivos. Ya sea que envuelvan a la célula ó que delimiten compartimientos u organelas en su interior; llevan a cabo importantes funciones celulares y se asocian con procesos a primera vista muy variados, que resultan indispensables para la vida.

Las membranas otorgan a las células su individualidad, separándolas del medio que las rodea. Merced a su permeabilidad, altamente selectiva, la célula puede regular su composición iónica y molecular, hecho de vital importancia, sobre todo para microorganismos que se encuentran en medios de composición muy variable.

Las células eucariotas contienen además membranas internas que delimitan organelas como mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y vacuolas, cuya aparición ha sido relacionada con la especialización funcional durante el transcurso de la evolución de las especies.

Las membranas también controlan el flujo de información entre células y contienen receptores específicos para estímulos externos; el movimiento de las bacterias (quimiotaxis), la respuesta de órganos blancos a determinadas hormonas ó la percepción de luz, son claros ejemplos de procesos donde el primer evento es la detección de una señal a nivel de la membrana. Alternativamente, algunas membranas son capaces de generar señales, ya sean químicas o eléctricas, desempeñando un papel determinante en la intercomunicación celular.

Además, los dos procesos más importantes de conversión de energía en las células, se llevan a cabo en sistemas localizados en membranas y constituidos por arreglos ordenados de enzimas, otras proteínas y lípidos: en la fotosíntesis,

la luz se transforma en energía de unión química y en la fosforilación oxidativa, se sintetiza ATP por oxidación de compuestos químicos.

El interés creciente de la bioquímica por la actividad de membranas celulares responde a las inquietudes expuestas por Doudoroff y col (1951) y Davis (1956), quienes fueron los primeros en señalar la importancia del problema del control del metabolismo y el crecimiento, así como la coordinación e integración de procesos bioquímicos en el seno de las células. ¿Cuáles son las propiedades que hacen de un ser viviente, una célula o una organela, una unidad fisiológica diferente del medio? En otras palabras ¿Qué les permite desarrollar actividades tan distintas de aquellas que se producen fuera de ella?

Es evidente que se requiere la existencia de una barrera que envuelva y aisle a las células del medio; al mismo tiempo, para vivir, crecer y reproducirse, cada célula debe comunicarse con el medio que la rodea para lo cual debe tener con éste un intercambio altamente organizado.

La membrana debe poseer características especiales y un claro ejemplo de ello es el funcionamiento de órganos como intestino y riñón cuya actividad se basa enteramente en procesos de permeabilidad de membrana.

Si los nutrientes que penetran en la célula lo hicieran simplemente por difusión, se debería admitir que el pasaje resultaría idénticamente libre para la salida, lo que traería graves consecuencias: a) los nutrientes al entrar y salir libremente alcanzarían un equilibrio y su concentración intracelular sería igual a la del medio externo, sin embargo, en muchos medios naturales la concentración de la mayoría de

los nutrientes es definitivamente baja, tan baja, que enzimas que debieran funcionar en tales condiciones, tendrían una actividad despreciable en virtud de sus parámetros cinéticos. b) los metabolitos intermediarios, libres en el interior de la célula, saldrían fácilmente del compartimiento intracelular generando un desperdicio de materia y energía.

Es decir, la membrana no se limita a cumplir una función pasiva, como una bolsa a través de la cual las moléculas difunden de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y surge la necesidad de considerar la existencia de sistemas que funcionen activamente para captar sustancias del medio después de haberlas reconocido.

Estos sistemas deben permitir la entrada de compuestos del medio a la célula, y eventualmente concentrarlos, impidiendo su salida a favor de un gradiente de concentración ó potencial químico.

Por lo tanto, la función de la membrana de separar los reactantes del medio y asegurar la acumulación de metabolitos o nutrientes sólo se lleva a cabo si ésta resulta selectivamente permeable.

La estructura lipoproteica de la membrana (Singer, 1975), a pesar de las diferencias de composición halladas en distintos tipos celulares, se considera permeable al H_2O , NH_3 , CO_2 , H_2 y O_2 moleculares; en contraste los iones como NH_4^+ , $H_2PO_4^-$, Na^+ , K^+ y H^+ , los aminoácidos y los glúcidos, atraviesan la membrana con dificultad.

La velocidad de difusión a través de la membrana de un gran número de compuestos orgánicos varía sistemáticamente con su estructura química y su volumen molecular (Diamond

y Wright, 1969), por ejemplo, el etanol ó las formas no ionizadas del ácido propiónico ó acético parecen atravesar la membrana en forma rápida (Conway y Downey, 1950, De la Peña y col. 1982). Sin embargo, la inmediata utilización del acetato o el piruvato por la levadura parecen involucrar mecanismos específicos de transporte (Barnett y Kornberg, 1960; Stoppani y Ramos, 1964). También la mitocondria (Lehninger, 1964) resulta impermeable a dadores o aceptores de electrones y a la mayoría de las sustancias que intervienen en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como citrato, alfaetoglutarato, etc, los cuales se hallan en su interior en concentraciones más elevadas que en el citoplasma. Si estas sustancias se agotan, no se puede restablecer la respiración por la provisión exógena de estos metabolitos, pero esta situación se revierte por sonicación de las mitocondrias, que implica la pérdida de su impermeabilidad por la ruptura de sus membranas.

Se han presentado numerosos ejemplos de permeabilidad selectiva como las observaciones en mucosa intestinal con distintos glúcidos y aminoácidos (Crane, 1960; Wilson, 1962; Benson y Rampone, 1966).

Las dificultades que ha encontrado la experimentación en el campo del estudio de la permeabilidad celular en diferentes tejidos se pone de manifiesto por la necesidad de aplicar métodos rigurosos como requisito indispensable para evidenciar la existencia de distintos sitios específicos y establecer interacciones múltiples y recíprocas en el transporte de aminoácidos y azúcares (Newey y Smyth, 1964; Saunders e Isselbacher, 1965; Alvarado, 1966).

1.3. El estudio de la incorporación de nutrientes en microorganismos permitió un avance importante en el conocimiento del proceso de transporte.

El estudio del transporte de nutrientes en microorganismos es más reciente que en tejidos animales, sin embargo, los resultados presentados en un corto tiempo, permitieron progresos considerables en el esclarecimiento del proceso de transporte gracias a la conjunción de varios factores.

La obtención del material experimental en forma simple y reproducible, y la posibilidad de aislar mutantes incapaces de tomar del medio una determinada sustancia, han constituido herramientas fundamentales en este estudio.

Doudoroff y col. (1951) presentaron evidencias de la independencia de los sistemas de transporte, utilizando una mutante de E.coli, incapaz de crecer en glucosa pero capaz de utilizar eficientemente maltosa, la que es hidrolizada a dos moléculas de glucosa para su metabolización. La ruptura de las células mostró que éstas poseían las enzimas necesarias para llevar a cabo la degradación de la glucosa, dejando en claro que la mutación afectaba exclusivamente el sistema de transporte de glucosa.

Un avance decisivo lo constituyó la proposición de Cohen y Monod, (Rickenberg y col. 1956; Cohen y Monod, 1957) del concepto de permeasa, proteína de membrana con sitios de reconocimiento y afinidad comparables a los de las enzimas.

Al igual que éstas, las permeasas podrían ser alteradas específicamente como consecuencia de una mutación, pudiéndose demostrar en algunos casos su naturaleza proteica

y la posibilidad de inducir selectivamente su síntesis por un determinado sustrato o análogo (Rotman y col. 1968)

Una dificultad surgida del empleo del término permeasa es la tendencia de asumir que una sola proteína es responsable del proceso de transporte, cuando por ejemplo, para el sulfato en S.typhimurium, parece requerirse los productos de cuatro genes (Dreyfuss y Pardee, 1966; Ohta y col 1971).

Por lo tanto se ha sugerido utilizar el término permeasa para el componente específico y denominar sistema de permeasa al complejo en su totalidad (Kepes y Cohen, 1962).

1.4. En bacterias los nutrientes utilizan múltiples sistemas de transporte específicos.

Desde que se describió la capacidad de acumular aminoácidos por S.faecalis (Gale, 1947) se han realizado un gran número de trabajos relacionados con esta observación. Los resultados obtenidos señalaron la existencia de distintos sistemas y mecanismos de transporte que se distinguen por el tipo de sus componentes, sus requerimientos energéticos, su localización y su regulación (Postma, 1976; Saier, 1977; Roseman y col. 1982; Neu y Heppel, 1966; Argast y Boos, 1979; Kyte, 1981). Los sistemas de transporte más extensamente estudiados en bacterias son: el sistema de translocación de grupos que requieren la participación de la fosfotransferasa, los sistemas mediados por proteínas de ligado, los sistemas acoplados a gradientes iónicos y los sistemas relacionados con poros de difusión específicos y proteínas de alta afinidad. La utilización de estos sistemas depende del tipo de bacteria y del sustrato, el cual puede ser transportado

por más de uno de estos sistemas como en el caso de fosfato (Rosenberg y col. 1977; Argast y col. 1978; Schweizer y col. 1982), arabinosa (Clark y Hogg, 1981; Kolodrubetz y Scheleif, 1981) galactosa (Darnwalla, 1981; Silhavy y col. 1978), el glutamato y el aspartato (Furlong y Schellenber, 1980) o la xilosa (Lam y col. 1980; Ahlem y col. 1982) demostrando, la flexibilidad de las bacterias para responder en función de sus necesidades a las variaciones del medio.

Algunos de los componentes de los sistemas, como por ejemplo las proteínas de ligado de maltosa o la de ribosa, o componentes del sistema de la fosfotransferasa, participan en la quimiotaxis actuando como verdaderos quimiorreceptores de sus sustratos.

Se han estimado en alrededor de cien los diferentes sistemas de transporte en E.coli, los que incluyendo sus genes regulatorios involucrarían un diez por ciento de la capacidad codificante de su genoma. Esto resalta la importancia que reviste para la célula disponer de un apropiado sistema de intercambio con el medio. Este concepto reafirma la observación de considerar a los sistemas de transporte como parte de las distintas vías metabólicas, más que como entidades aisladas asociadas a la función de membranas.

1.4.1. Sistema de la fosfotransferasa.

Primeramente descrito por Roseman (1964), involucra una serie de proteínas de membrana, actualmente bien caracterizadas, que llevan a cabo la incorporación unidireccional de varios azúcares, los cuales son fosforilados en su translocación utilizando fosfoenolpiruvato como dador del grupo fosfato (Postma, 1981).

Este sistema es un ejemplo de sistemas de translocación de grupo, caracterizados por la modificación química del sustrato, simultánea con su translocación. Asimismo se ha establecido que este sistema participa en procesos de regulación metabólica como represión catabólica vía AMP_c (Harwood y col. 1976), modulación del transporte de azúcares que utilizan otros sistemas (Dills y col. 1980) y la ya mencionada participación en la quimiotaxis (Adler y Epstein 1974).

1.4.2. Sistemas mediados por proteínas de ligado.

Estos sistemas se han caracterizado en bacterias Gram negativas, a partir del aislamiento de proteínas de ligado (Anraku, 1968 a,b,c) liberadas por el tratamiento osmótico descrito por Neu y Heppel (1966). Estas proteínas son solubles, están localizadas en el espacio periplasmático y se han hallado para un gran número de sustratos como azúcares, aminoácidos, iones, glicerol, fosfato y vitamina B₁ (Ahlem y col. 1982; Argast y Boos, 1979; Higgins y col. 1982) y participan como elementos esenciales en el reconocimiento de un sustrato por su sistema de transporte.

Se ha establecido que estos sistemas poseen alta afinidad (Kellerman y Szmelcman, 1974) con K_d 10^{-6} - 10^{-7} M., los sustratos no resultan modificados químicamente durante su translocación y alcanzan relaciones de concentración intra/extracelular del orden de 10^4 (Szmelcman y col. 1976).

Los sistemas están constituidos por una serie de proteínas cuyo mecanismo de acción se suele asociar al de una ATPasa, requiriendo para el transporte la hidrólisis de ATP o algún otro intermediario fosforilado.

Sus componentes mejor conocidos son las respectivas proteínas de ligado, que llegan a constituir el treinta o cuarenta porciento de las proteínas liberadas por el tratamiento osmótico en células inducidas.

En varios casos sus genes estructurales han sido clonados y algunos, como el de la arabinosa, la galactosa, la leucina o la histidina han sido secuenciados (Möller y col. 1982; Oxender y col. 1980; Ardeshir y col. 1981, Mahoney y col. 1981).

Las proteínas sufren cambios conformacionales como consecuencia de su unión al sustrato, los cuales se han puesto en evidencia por medidas de fluorescencia (Weiner y Heppel, 1971), absorción de luz ultravioleta (Mc Gowan y col. 1974) espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Robertson y col. 1977) o movilidad electroforética (Boos y col. 1972) sugiriéndose que por este cambio conformacional el sustrato ligado resulta inaccesible desde la solución. Tanto para la proteína de ligado de galactosa como para la de histidina se estableció, en concordancia con resultados obtenidos por cristalografía de rayos X, (Quirocho y col. 1979), la existencia de dos dominios globulares con el sitio de unión del sustrato localizado entre ambos, este sitio resulta ocluido cuando se halla ocupado por su ligando específico.

Las proteínas de ligado poseen además otro sitio específico de unión, a través del cual interactúan con alguna de las proteínas del sistema que se hallan localizadas en la membrana citoplasmática. Este segundo sitio se halla ausente en determinadas mutantes capaces de ligar el sustrato pero no de translocarlo.

Se han descripto distintas proteínas de membrana relacionadas con estos sistemas de transporte, siendo tres para

histidina y maltosa Q, M, P (Higgins y col. 1982) y F, G y K (Shuman y col. 1980 y Shuman y Silhavy, 1981) respectivamente, habiéndose establecido los genes que las codifican. Entre éstas, las proteínas P y K presentan un treinta por ciento de analogía (Gilson y col. 1982). El conjunto de estas proteínas de membrana sería responsable de la captación del sustrato proveniente de la proteína de ligado para su translocación, y aunque se han postulado modelos muy apropiados sobre su funcionamiento, aún quedan algunos aspectos sin esclarecer (Shuman, 1982; Cross, 1981).

1.4.3. Sistemas acoplados a gradientes iónicos.

Además de las bombas primarias del tipo de los sistemas dependientes de proteínas de ligado, es posible reconocer en bacterias sistemas indirectamente acoplados al consumo de energía a través de gradientes iónicos, de acuerdo con la teoría de Mitchell (1972). El mejor comprendido de estos sistemas es el de la lactosa en E.coli. Este sistema está acoplado al movimiento de iones H^+ , definiendo un cotransporte H^+ /lactosa. Posee simetría respecto de la entrada y salida del glúcido (Teather, 1977) y está constituido por una sola proteína que operaría "in vivo", presumiblemente como un dímero.

El sistema fue originalmente descrito por Rickenberg, Cohen, Buttin y Monod, 1956, como "permeasa de galactósidos", la cual utiliza eficazmente, como sustrato, compuestos con un anillo galactopiranosido de configuración D, con el oxhidrilo de la posición seis libre. Ya que la lactosa resultó el glúcido natural de mayor afinidad, el sistema fue denominado "lac permeasa".

El gen de la lac permeasa, LAC Y, pertenece al lac operón

que ha sido extensamente estudiado (Miller y Reznikoff, 1978). El producto del gen LAC Y fue identificado por Fox y Kennedy (1965, 1969), quienes la denominaron proteína M por ser una proteína de membrana. Esta estaba ausente en mutantes lac Y pero resultaba nuevamente detectable en células de esta cepa, transformadas con un plásmida LAC Y (Teather y col. 1978).

La proteína M presenta un sitio de ligado para el sustrato sensible a reactivos de grupos tioles como N-etilmaleimida, propiedad que fuera utilizada para su aislamiento y purificación (Fox y Kennedy 1965; Jones y Kennedy, 1969). Poseen además un segundo sitio de unión para el protón, ausente en mutantes donde una histidina es reemplazada por una lisina o una arginina (West, 1980), desacoplando el transporte a la fuerza protónmotriz. Se han hallado otras mutantes que fenotípicamente presentan este desacople (Plate y Smit, 1981) pero la mutación mapea fuera del gen LAC Y, proponiéndose por este motivo la existencia de una proteína adicional o "factor de acoplamiento energético".

Distintos compuestos transportables por el sistema se emplearon como marcadores de afinidad (Yariv y col. 1972), fotoafinidad (Kaczorowski y col. 1980) y dansil-galactósidos fluorescentes (Schuldiner y col. 1975, 1976) para conocer el mecanismo de transporte de galactosa por la proteína M.

Aportes muy importantes para el conocimiento de estos sistemas se consiguieron con el empleo de vesículas de membrana citoplasmática de E.coli, en las cuales se elimina toda posible interferencia debida al metabolismo celular. Recientemente se demostró que la fuerza impulsora del transporte, el gradiente electroquímico de protones, puede ser generado en vesículas por oxidación de dadores de electrones

como D-lactato, ascorbato o metasulfato de fenacina. (Ramos y col. 1976; Ramos y Kaback, 1977, 1977a). Ambos componentes de esta fuerza protónmotriz, el gradiente eléctrico, $\Delta\psi$, y el de concentración de protones, ΔpH , resultan claramente distinguibles y pueden medirse y modificarse en forma independiente.

En vesículas energizadas se ha observado aumento del número de sitios de ligado (Rudnik y col 1976) y una modificación de la afinidad aparente por el sustrato (Toci y col. 1980), determinándose la reducción del K_M del transporte de lactosa, en aproximadamente dos órdenes de magnitud, por la imposición de una fuerza protónmotriz de magnitud fisiológica (Robertson y col. 1980).

1.4.4. Otros sistemas.

En membrana externa de bacterias Gram negativas se han descrito proteínas de alta afinidad, de las cuales dependen algunos sistemas de transporte como el de la vitamina B_{12} y el de ciertos complejos de hierro (Braun y Hantke, 1981). Su fuente energética es el gradiente de protones (Pugsley y Reeves, 1977) y requieren para su funcionamiento del producto del gen *tan B* (Plastow y Holland, 1979). Su funcionamiento no ha sido aún debidamente aclarado.

También se ha descrito la existencia de un transporte mediado de difusión simple (Sanno y Wilson, 1968) o poro, con especificidad por glicerol y otros polialcoholes lineales pero no para azúcares o polialcoholes fosforilados.

Las bacterias Gram negativas presentan además una serie de proteínas denominadas "Porinas" (receptor λ , OmpC y OmpF en *E. coli*) originalmente descritas por Nakae

(1975). Se han publicado un gran número de observaciones sobre estas proteínas en relación con su estructura, regulación, biosíntesis, ensamblado y funciones. (Revisión: Garavito y Rosenbusch, 1980) y cuyas características se pueden resumir de la siguiente manera: a) Presentan estructuras ordenadas de tres unidades idénticas que interactúan con el lipopolisacárido y posiblemente con el péptido glicano de la pared celular b) No pertenecen a un sistema de transporte en particular, siendo básicamente poros de difusión para pequeñas moléculas hidrofílicas c) Su síntesis se halla regulada por la composición química y la presión osmótica del medio y d) Algunas resultan receptores para fagos.

1.5. En las levaduras los nutrientes utilizan sistemas de transporte específicos y generales.

Mientras que en las bacterias la entrada de un aminoácido, como la valina, es inhibida sólo por aminoácidos estructuralmente relacionados, como isoleucina o leucina (Cohen, 1956), en levaduras y en tejidos animales se han señalado numerosos casos de inhibición de la entrada de un aminoácido por prácticamente todos los otros aminoácidos (Taylor, 1947; Surdin y col. 1965; De Busk y De Busk, 1965). Este hecho muestra que desde el punto de vista de la permeabilidad celular las levaduras presentan similitudes con las células de mamíferos, comparte con estas células la organización nuclear de su genoma; son organismos eucariotas.

Las levaduras presentan, como las bacterias, ventajas para su estudio por la facilidad de su obtención y la posibilidad de aislar mutantes que permiten realizar un estudio

genético, relaciones de dominancia, recesividad, alelismo, etc.

El intercambio de ideas en estos campos ha sido indudablemente fructífero en proveer analogías entre los distintos sistemas de transporte, en marcar sus diferencias y en enfatizar las limitaciones del empleo de los distintos tipos celulares como material de experimentación (Eddy, 1982).

En levaduras Saccharomyces, del mismo modo que en bacterias y en otras células, el pasaje de nutrientes como iones, glúcidos, aminoácidos, etc. a los cuales la estructura lipídica de la membrana resulta impermeable, parece requerir la presencia de una serie de transportadores o "carriers", permeasas, que permiten selectivamente la incorporación de los distintos sustratos, asumiéndose en general que esa selectividad se basa en el funcionamiento de proteínas específicas.

Los trabajos de Grenson establecieron las bases genéticas de la incorporación de aminoácidos por las levaduras ya que una gran variedad de éstos son incorporados por la célula pudiendo competir entre sí (Halvorson y Cohen, 1958 Surdin y col. 1965). Surdin en 1965 y posteriormente Grenson y Hennaut detectaron la existencia de un gen relacionado con la incorporación de casi todos los aminoácidos de configuración L o D, y lo denominaron, a este sistema, "permeasa general de aminoácidos". Esta permeasa es reprimida por el crecimiento de las células en amonio (Grenson y Hou 1972) mientras que su actividad se incrementa, por lo menos en un factor de diez, al emplearse prolina o glutamato como fuente de nitrógeno (Grenson y col. 1970). Distintos genes

se han asociado al mecanismo regulatorio de la permeasa general como el gdh A, glutamato deshidrogenasa NADPH dependiente (Grenson, 1972; Roon y col. 1975) amc (Rytka, 1975; Grenson y Acheroy, 1982) Mut 2, Mut 4, PGR (Grenson 1983, 1983a).

El empleo de condiciones de represión de la permeasa general incrementa la actividad de otras permeasas, como la glutamina (Darte y Grenson, 1975) o la prolina (Grenson y col. 1970; Brandriss y Magasanik, 1979), extendiéndose esta observación a S.chevalieri (Magaña-Schwencke y col. 1973) y se ha sugerido que su desrepresión involucra la síntesis de un mRNA específico (Kuznar y col. 1973).

Queda claro que en estas condiciones la incorporación de aminoácidos depende de permeasas específicas como la de arginina y lisina (Grenson, 1966), metionina (Gits y Grenson, 1967), histidina (Crabeel y Grenson, 1970) ó las dos de aminoácidos dicarboxílicos (Darte y Grenson, 1975).

Por lo tanto, en el estudio de la incorporación de aminoácidos en células crecidas en ausencia de amonio, se observa un aumento de la incorporación acompañada de una aparente pérdida de especificidad debido a la actividad de la permeasa general.

Los aminoácidos intracelulares podrían salir al resuspenderse las células en medios libres de aminoácidos, no obstante, se ha descrito inicialmente para el glutamato (Taylor, 1949) y confirmado posteriormente para otros aminoácidos, que ellos son tenazmente retenidos por la célula. Aunque haya sido detectado cierto grado de eflujo para leucina (Ramos, 1975) o prolina (Magaña-Schwencke, 1973), y en algunos casos las pérdidas de aminoácido intracelular no se hayan atribuido definitivamente a su salida o a su metaa

bolización (Woodward y Cirillo, 1977), la velocidad de eflujo fue siempre mucho menor que la de influjo (Kotyk y col. 1971; Karst y Jund, 1976; Seaston y col. 1976; Indge y col. 1977) considerándose el proceso de influjo como prácticamente irreversible.

Más aún, es imposible determinar la salida de histidina (Crabeel y Grenson, 1970) o sustratos como alantoina (Sumrada y Cooper, 1977), en contraste con el comportamiento de otros compuestos como uracilo (Jund y col. 1977) o citosina (Chevallier y col. 1975), que pueden ser excretados rápidamente por la célula en determinadas condiciones.

Distintos factores contribuyen a esta virtual irreversibilidad de la permeasa en condiciones fisiológicas (Hunter y Segel, 1973), y se distinguen posibles controles alostéricos de las permeasas, en relación con el incremento de la concentración intracelular de su sustrato u otro efector (Cuppoletti y Segel, 1974).

Otra situación a considerar es que el sustrato resulte "secuestrado" por alguna organela y por lo tanto no resulte accesible a la permeasa desde el interior de la célula. En relación con este hecho se ha considerado la participación de la vacuola, ya que existen claras evidencias de que "in vivo" se concentran en ésta purinas, polifosfatos y algunos aminoácidos (Wiemkem y Dürre, 1974; Ureck y col. 1978; Dürre y col. 1979). Las observaciones más recientes indican que sólo los aminoácidos básicos son concentrados por la vacuola, en el caso de la arginina ésta llega a concentrarse alrededor de treinta veces respecto del citosol. Estos resultados plantearon el interrogante respecto del mecanismo por el cual se produce la acumulación de

aminoácidos. El aislamiento y purificación de membranas de vacuola ha permitido la preparación de vesículas, mediante las cuales se ha estudiado esta incorporación en profundidad, dejando establecido la existencia de un proceso de transporte activo de calcio y aminoácidos, éste funciona como un contratransporte H^+ /sustrato a expensas de la disipación de un gradiente de protones, generado por una ATPasa localizada en la membrana de la vacuola, la cual es distinguible de las ATPasas mitocondrial y citoplasmática (Kakinuma y col. 1981; Oshumi y Anraku, 1981).

En levaduras también se ha observado la fosforilación de sustratos transportados como en el caso de algunos monosacáridos (Rosenberg y Wilbrandt, 1952). Varios autores (Cirillo, 1961; Kuo y Cirillo; Kuo y col. 1970; Kotyk, 1967; Kotyk y Michaljanicova, 1974) han propuesto que la glucosa y la galactosa son transportadas por un mecanismo de difusión facilitada, en tanto que otros autores (Van Steveninck 1972), han sugerido la participación de un sistema fosforilante que opera en forma conjunta y que utiliza a los polifosfatos como dadores del grupo fosfato. Más aún, entre los sistemas de transporte de glucosa y galactosa, existen también diferencias, el primero es constitutivo (Cirillo, 1968) en tanto que el segundo es inducible (Kuo y col. 1970) y sensible a la represión por glucosa (Holzer, 1976).

La fructosa, la manosa y la xilosa comparten con la galactosa la característica de que su incorporación está regulada por el balance energético celular (Sols, 1967), la velocidad de incorporación es mayor en condiciones anaeróbicas que en aeróbicas, efecto Pasteur, y se observa que los valores de las constantes de Michaelis son mayores en aerobiosis que en anaerobiosis o en aerobiosis, en presencia de

dinitrofenol (Kotyk, 1967; Serrano y De la Fuente, 1974).

Teniendo en cuenta los importantes avances surgidos del estudio de la incorporación de nutrientes en bacterias, como el caso de los requerimientos de proteínas periplasmáticas o los sistemas localizados en vesículas de membrana citoplasmática y la participación de gradientes iónicos, se efectuaron en levaduras investigaciones similares a las realizadas en bacterias. a) Incorporación en vesículas de membrana citoplasmática. Diversos experimentos se realizaron a pesar de las dificultades que presenta el aislamiento de membranas citoplasmáticas libres de otro tipo de membranas subcelulares, así se han descrito preparaciones de vesículas capaces de transportar aminoácidos (Christensen y Cirillo, 1972; Fuhrman y col. 1976; Merkel y col. 1980), algunas de ellas con actividad de ATPasa orientada hacia el interior de las mismas (Fuhrman y col. 1976). Más recientemente se ha publicado la obtención de vesículas mixtas de membranas citoplasmáticas y fosfolípidos exógenos que incorporan glucosa de acuerdo con un mecanismo de difusión facilitada (Franzussoff y Cirillo, 1983). Las investigaciones que permitirían conocer el proceso de incorporación en forma independiente del metabolismo celular, no han brindado hasta el presente resultados tan relevantes como los obtenidos en bacterias. b) Participación de componentes del espacio periplasmático. Algunos autores describieron el aislamiento de proteínas de ligando en el fluido obtenido del espacio periplasmático de levaduras, por tratamiento de choque osmótico, para leucina (Wainer, 1985; Bussey y Umbarger, 1970), fenilalanina (Vorisek, 1972), tiamina (Iwashima y Nishimura, 1979), prolina (Schwencke y col. 1971) y arginina o lisina (Opekarova y col. 1975), esta última

proteína es incapaz de reestablecer el transporte en células sometidas a choque osmótico. c) Incorporación en protoplastos. El estudio en protoplastos, células libres de pared celular, permite establecer el papel definitivo de la pared celular y el espacio periplasmático en los procesos de transporte. Theuvenet y Bindels (1980) demostraron que los protoplastos resultan modelo apropiado para el estudio del transporte de iones y el análisis de los efectos producidos sobre éste por moléculas complejas, como algunos antibióticos, que por su estructura no pueden atravesar la pared celular. Jeanjean y col. (1982) demostraron en C.tropicalis la pérdida del sistema de alta afinidad para el transporte de fosfato al estudiar su transporte en protoplastos y detectaron la liberación al medio de una proteína de ligando para fosfato, que describieran previamente (Jeanjean y Fournier, 1979), a partir de células sometidas al choque osmótico.

No obstante, los parámetros cinéticos, los requerimientos energéticos, la sensibilidad a determinados inhibidores y el efecto del pH no se modificaron al estudiar el transporte de guanina en protoplastos de Schizosaccharomyces pombe (Housset y col. 1975). La tiamina (Nishimura y col. 1983) resultó acumulable en protoplastos de S.cerevisiae de la misma manera que en células intactas, hecho que sugiere que la proteína de ligando de tiamina descrita anteriormente (Iwashima y Nishimura, 1979) no resulta un componente esencial del sistema de transporte. d) Participación de los gradientes iónicos de membrana. Para comprender mejor el funcionamiento de las permeasas de levadura resulta indispensable considerar los avances realizados en los

estudios del mecanismo energético acoplado. De ellos, quizás el más importante ha sido la demostración de que la incorporación de aminoácidos está íntimamente asociada al flujo de protones y eventualmente al de iones K^+ (Davies y col. 1953; Eddy, 1966; Eddy y Nowacki, 1971), generándose un incremento en la incorporación de glicina con el descenso del pH y la concentración de K^+ del medio. Estas observaciones permiten considerar que la concentración de aminoácidos se lleva a cabo a expensas del movimiento de estos iones, a favor de su gradiente de concentración y se ha sugerido un papel de cotransportador para el protón y un papel facultativo para el potasio (Eddy y col. 1970). Este mecanismo se verificó también para otros aminoácidos (Seaston y col. 1973) y distintos sustratos como alfa-metil glucósido (Broklehurst y col. 1977), maltosa (Seaston y col. 1973; Serrano, 1977), fosfato (Cockburn y col. 1975; Roomans y Borst Pawels, 1979), sulfato (Roomans y col. 1979b), obteniéndose resultados concluyentes por el empleo de electrodos selectivamente sensibles a H^+ o K^+ .

El número de protones que se incorpora con un determinado aminoácido, como por ejemplo glicina, varía entre uno y dos, pero no se conoce aún la causa de esta variación (Eddy, 1978).

Otras evidencias han indicado la participación del gradiente a través de la membrana en el proceso de incorporación. Por ejemplo, la inhibición del transporte de aminoácidos por el dinitrofenol, en células con bajo contenido de ATP, es consistente con un colapso del gradiente de protones (Mitchell, 1963), el efecto inhibitorio de distintos protonóforos sobre el transporte de leucina (Ramos y col. 1980) y la sensibilidad del proceso a la acción de

inhibidores de la ATPasa de membrana citoplasmática. Esta enzima sería la responsable de la generación del gradiente iónico, ya que se observa rápida extrusión de protones por la levadura con la disponibilidad de ATP o alguna fuente de energía como glucosa (Serrano, 1977).

Este cotransporte H^+ /sustrato no se observa con glucosa pero se verifica con maltosa y otros azúcares, la absorción de maltosa no parece requerir ATP ya que persiste cuando la respiración o la glucólisis se inhiben con iodoacetamida o 2-desoxiglucosa.

Indudablemente, la respuesta correcta para el problema transporte-gradiente de membrana, debe surgir de las medidas del potencial electroquímico de membrana de levadura, como ha sucedido en bacterias. Así, se ha descrito la acumulación de cationes lipofílicos en células de levaduras (Vacata y col. 1981; Boxman y col. 1982) indicando la existencia de un potencial eléctrico a través de su membrana citoplasmática. El aislamiento y caracterización de una ATPasa de membrana citoplasmática (Matile y col. 1967; Slayman y Slayman, 1974; Serrano, 1980) sugiere que ésta sería capaz de generar ese gradiente de protones (Serrano, 1977) estando a la vez relacionada con el transporte y acumulación de iones como potasio y otros metabolitos.

Sin embargo, la medida de los parámetros que constituyen el gradiente electroquímico de protones y su relación con el transporte en estas células, no ha sido definitivamente establecido (De la Peña y col. 1981; Eddy y col. 1977; Barts y col. 1980; Serrano, 1980).

1.6. Numerosos interrogantes subsisten en el conocimiento de los procesos de transporte de nutrientes en levaduras.

Son numerosas las evidencias presentadas que reflejan

la compleja maquinaria puesta en marcha por la célula para regular e integrar su metabolismo de acuerdo con las condiciones ambientales. En el pasado, se ha orientado el estudio de este control sobre la expresión de determinados genes, habiéndose considerado la inducción y represión de la síntesis de distintas enzimas, como el principal mecanismo celular que permite el pasaje de una condición metabólica a otra y los procesos de transporte han sido considerados, simplemente, como el medio por el cual las células recolectan metabolitos y precursores para su supervivencia. Una visión tan simplista de este problema, es, a la luz de los resultados presentados, poco satisfactoria, y el siguiente ejemplo pone claramente en evidencia esta observación: el agregado de alantoína o uno de sus productos de degradación, como fuente de nitrógeno a un cultivo de S.cerevisiae, induce la síntesis de las enzimas degradativas necesarias para su utilización. Si a este cultivo se le agrega una fuente de nitrógeno más apropiada como serina, la síntesis de las enzimas degradativas de alantoína se detiene. Este sería el mecanismo de control apropiado si las enzimas tuvieran una alta velocidad de recambio, pero este no es el caso, ya que las células permanecen competentes para degradar alantoína durante dos o más generaciones. Un proceso definitivamente distinto se observa al estudiar la incorporación de alantoína; su incorporación cae abruptamente hasta valores indetectables minutos después de agregada la serina, demostrando que la regulación del transporte resulta el medio preeminente para detener el metabolismo de la alantoína, tras la adición de una mejor fuente de nitrógeno al cultivo (Cooper y Lawther, 1973).

Existen un gran número de situaciones como ésta que reflejan la importancia que los mecanismos de transporte tienen para la célula y en consecuencia, el desafío que la comprensión y elucidación de su funcionamiento plantean a la ciencia en la actualidad.

En el caso de las bacterias este desafío ha encontrado respuestas satisfactorias con una seria sustentación experimental, en cambio en las levaduras subsisten muchas incógnitas a develar: ¿Porqué existen sistemas múltiples y específicos?; ¿Qué relación hay entre ellos?; ¿Qué importancia biológica tiene su funcionamiento?; ¿Cuáles son los componentes de esos sistemas y cuál es su localización?; ¿Cuáles son los requerimientos energéticos: componentes de alta energía, gradientes iónicos de membrana y en este caso cómo y cuándo regulan las membranas de levaduras la participación del $\Delta\Psi$ y del ΔpH ? En adición, a semejanza de células de mamíferos y a diferencia de la generalidad en bacterias, ¿Requieren gradientes de cationes alcalinos?

A la respuesta de estos interrogantes deben orientarse las futuras investigaciones que permitan, conjuntamente con los estudios genéticos, establecer las bases moleculares de los procesos de transporte.

1.7. Objetivos.

Los estudios sobre el consumo de sustratos exógenos y endógenos en levaduras Saccharomyces, realizados por Stoppani A.O.M. y Ramos, E.H., señalaron la participación de procesos de incorporación y la importancia de conocer el mecanismo de transporte de nutrientes a través de la barrera de permeabilidad.

Trabajos posteriores demostraron que la L-leucina es un sustrato apropiado para investigar las propiedades del proceso de incorporación de aminoácidos debido a su lenta metabolización.

Asimismo, las levaduras Saccharomyces cerevisiae, por poseer un metabolismo anaeróbico facultativo, permiten discriminar en condiciones fisiológicas los procesos generadores de energía aeróbicos o anaeróbicos, lo que agregado a la posibilidad de obtener mutantes permite considerarlas como organismos muy útiles para el estudio de los procesos de incorporación.

En efecto, el empleo de mutantes citoplasmáticas ρ^- , deficientes respiratorias, carentes de un sistema de transferencia de electrones por falta de citocromos b y a_{13} , permitió establecer la utilización de sustratos metabolizables en forma anaeróbica estricta.

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de los procesos de transporte, analizar las posibles interacciones entre componentes y sustratos, esclarecer los requerimientos energéticos y contribuir al conjunto de los modelos postulados, se decidió estudiar la incorporación de L-leucina en S.cerevisiae cepa silvestre JB65 y JB64 mutante deficiente

en el translocador ATP/ADP mitocondrial.

El empleo de una mutante como la JB64 permitirá establecer condiciones intermedias entre el déficit respiratorio absoluto de las células ρ^0 , y el metabolismo aeróbico de las células silvestres.

En la cepa silvestre y en esta mutante, capaz de llevar a cabo procesos respiratorios y en la cual se halla restringida la provisión de ATP de la mitocondria al citoplasma, se decide investigar las propiedades generales del proceso de incorporación, la participación de distintos sistemas transportadores, su caracterización cinética, sus requerimientos energéticos, y el establecimiento y participación de gradientes de potencial de membrana en la incorporación de L-leucina.

Asimismo, para conocer la localización de entidades de la barrera de permeabilidad se plantean dos tipos de experimentos; indagar las propiedades de la incorporación de L-leucina en protoplastos libres de pared celular y espacio periplasmático y la participación de grupos tioles de proteínas involucradas en la incorporación de L-leucina, en células enteras y protoplastos.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Levaduras.

En el presente trabajo se emplearon células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa silvestre JB65 y mutante JB64, deficiente en el translocador ATP/ADP mitocondrial, obtenida a partir de la cepa silvestre por resistencia al ácido bongkréquico (Lanquin y col. 1973). Ambas cepas fueron cedidas por el Dr. J.R. Mattoon (Departamento de Biología, Universidad de Colorado, Colorado Springs. EEUU).

2.2. Mantenimiento de las cepas de levadura.

Las levaduras empleadas se conservaron por repiques periódicos en viales con tapa a rosca, conteniendo medio sólido Wikerham (1951) compuesto por: 3 g. extracto de malta, 5 g. de peptona y 10 g. de glucosa en 1 litro de agua, pH 5, agar 30 g; esterilizado en autoclave 15 minutos a 1,5 atmósferas. Las levaduras se mantuvieron a 4°C.

2.3. Condiciones de crecimiento.

Puesto que la agitación y la aereación son dos variables importantes determinantes de la eficiencia del crecimiento, los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer conteniendo medio Wikerham líquido (sin agar), en un agitador rotatorio New Brunswick modelo G-10 (New Brunswick Scientific Sale. Co. Inc., N.J., EEUU), operando a 200-250 rpm, a una temperatura ambiente de 30°C, en cámara de cultivo, con un volumen de medio de cultivo limitado al 10-15% de la capacidad del frasco.

El inóculo sembrado se dejó desarrollar hasta alcanzar el final de la fase logarítmica de crecimiento.

Las células fueron cosechadas por centrifugación a 4°C en una centrífuga refrigerada International modelo PR-2,

(International Equipment Company, Mass., EEUU) y lavadas dos veces con agua recientemente destilada. Se resuspendieron luego en 100-120 ml. de agua destilada y se ayunaron durante la noche en condiciones de aeración constante.

Cumplido el ayuno, la suspensión fue centrifugada nuevamente a 4°C y se repitieron los lavados con agua destilada. El sedimento obtenido constituye las denominadas "celulas ayunadas".

2.4. Curvas de crecimiento.

El conocimiento de la curva de crecimiento es requerida para los estudios experimentales, puesto que las condiciones fisiológicas celulares, en un medio nutritivo adecuda, varían en los diferentes estadios de crecimiento.

Los cultivos de levadura exhiben una curva de crecimiento caracterizada por tres fases: a) fase inicial o de inducción (fase lag); b) fase exponencial de crecimiento o de división de microorganismos a velocidad constante (fase log); y c) fase terminal estacionaria.

En general, el crecimiento se sigue midiendo la turbidez de suspensiones de levadura en espectrofotómetro, usando diferentes longitudes de onda, comúnmente 570, 600 ó 660 nm. Puesto que la relación entre número de células y absorbancia es lineal en un rango reducido, es conveniente utilizar muestras diluidas para las medidas turbidimétricas.

El tiempo transcurrido entre la división de una célula y la división siguiente se conoce con el nombre de "tiempo de generación", que si se observa en un solo organismo fluctúa considerablemente de un caso a otro; sin embargo en una población apreciable, como es un cultivo, el tiempo total

de generación para todos los individuos del cultivo es casi constante y se denomina "tiempo de generación medio" (G) cuya determinación es importante para la descripción del crecimiento de un microorganismo (Monod, 1949).

G puede determinarse graficando en papel semilogarítmico el crecimiento celular (por ejemplo A_{570}) en función del tiempo y establecer el tiempo transcurrido para que la absorbancia se duplique.

Las ecuaciones básicas son:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (1) \text{ que da la velocidad de aumento de una población.}$$

integrando:

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu \cdot t \quad (2)$$

$$\ln 2 = \mu \cdot G \quad (3)$$

donde: $N = n^\circ$ de células

$N_0 = n^\circ$ inicial de células

$\mu =$ constante específica de crecimiento

$t =$ tiempo

por lo tanto:

$$G = \frac{0.693}{\mu} \quad (4)$$

El valor de μ varía tanto con el tipo de medio de cultivo empleado como con las características genéticas de la levadura.

Para calcular G, de dos puntos de la curva de crecimiento en la fase exponencial N y N_0 :

$$G = \frac{t \cdot 0.693}{\ln \frac{N}{N_0}} \quad (5)$$

Cuando la densidad óptica es usada como medida del nú-

mero de células:

$$G = \frac{t \cdot 0,693}{\ln \frac{D}{D_0}}$$

Procedimiento:

Se prepararon inóculos de suspensión de levaduras en 10 ml. de amortiguador fosfato de sodio 0,05 M. pH 7, estéril, con los que se sembró el medio de cultivo cuya densidad óptica resultó aproximadamente 0,005.

Se tomaron alícuotas asepticamente, en función del tiempo y se determinó su A_{570} obteniendo el conjunto de datos que graficados permitieron establecer:

	cepa silvestre	cepa mutante
tiempo para alcanzar		
la fase estacionaria	17,5 hs	16 hs
tiempo de generación	1 h 40 min	1 h 20 min

Ninguna cepa presentó una curva diáuxica.

2.5. Suspensión de trabajo.

Correlación entre número de células y peso seco.

El sedimento de células ayunadas se resuspendió en agua destilada y se efectuaron recuentos en cámara de Neubauer.

La concentración celular se estimó diluyendo en agua una alícuota de la suspensión de levaduras (1:100) y se leyó por turbidimetría en un fotocolorímetro Crudo Caamaño (Laboratorio Crudo Caamaño, Buenos Aires, Argentina) empleando filtro verde. El dato obtenido se interpoló en una curva standard trazada con concentraciones conocidas de suspensión celular. El valor de la concentración así establecido se consideró aproximado, y se constató en cada experimento median-

te el método patrón de pesada de una alícuota de trabajo que se secó en estufa a 104°C durante 24 hs.

Cuando se ensayaron protoplastos la concentración celular se estimó por recuento y se verificó su contenido en proteínas por el método de Lowry (1951) utilizando albúmina bovina como standard.

2.6. Técnica de incubación.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 30°C en un baño agitador rotatorio New Brunswick modelo G-76, con una mezcla de incubación cuya composición fue la siguiente: suspensión de levaduras o protoplastos (concentración necesaria para obtener 1 mg. de peso seco de levaduras o 1 mg. de proteínas de protoplastos por muestra), amortiguador ftalato ácido de potasio (FHK) 20 mM. pH 4,5 y las adiciones que se especifican en cada caso. El volumen final de esta suspensión varió en función del número de muestras a extraer.

2.7. Preparación de protoplastos.

Para la preparación de protoplastos se empleó un método biológico, basado en la capacidad de ciertas enzimas de degradar la pared celular de hongos y levaduras.

Las células de levaduras cosechadas en la fase logarítmica tardía y lavadas con agua destilada, se resuspendieron en concentración aproximada 10^9 cél/ml. en solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM pH 8,9 conteniendo dithiothreitol (DTT) 5 mM. y ácido etilén-diamino-tetraacético 5 mM (EDTA). Estas suspensiones se incubaron a 30°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 4°C durante 5-10 minutos a 3000 x g en centrífuga Sorvall modelo RC-2B

(rotor SS 34), el sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó dos veces con agua destilada.

Estas células pretratadas se incubaron a 30°C, en igual concentración, con la enzima Helicasa (laboratorios ISF. Industrie Biologique Francaise) 1% P/V en solución suplementada con estabilizador osmótico sorbitol 1M.

La transformación de células en protoplastos se siguió en función del tiempo por dilución 1:10 de alícuotas de la mezcla de reacción en agua o sorbitol, verificándose la lisis de los protoplastos en medio hipoosmótico, dilución que no afecta las células enteras.

Al cabo de aproximadamente 40-45 minutos la digestión se detuvo por centrifugación a 3000 xg durante 5 minutos, los protoplastos del sedimento se lavaron 2 veces con sorbitol 1 M. a 0-4°C y se determinó el porcentaje de células transformadas por recuento de alícuotas diluidas, alternativamente, en agua o sorbitol 1 M.

Los protoplastos así obtenidos se conservaron en frío (0-4°C) hasta su posterior utilización.

2.8. Coloración de PAS.

La coloración de PAS (ácido peryódico de Schiff) se realizó sobre extendidos de levaduras enteras y protoplastos.

Los extendidos se fijaron con carnoy (ácido acético-etanol-cloroformo 1 : 6 : 3) y luego fueron sumergidos en ácido peryódico 0,5% durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con agua y se sumergieron en reactivo de Schiff (fucsina básica reducida con anhídrido sulfuroso) durante 5 minutos, al cabo de los cuales se lavaron, y una vez secos se montaron con bálsamo de Canadá para su observación mi-

croscópica.

2.9. Coloración vital.

Suspensiones de protoplastos de 10^5 células/ml. en estabilizador osmótico salino, cloruro de potasio 0,6 M, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos con 0,2 ml de solución de colorante trypan blue 0,2% en cloruro de potasio 0,6 M.

Al cabo de ese período se efectuaron recuentos celulares distinguiendo células coloreadas (no viables) de no coloreadas (viables).

2.10. Determinación de L- 14 C leucina intracelular.

2.10.1. Células enteras.

Luego de la adición de L- 14 C leucina a la mezcla de incubación, se extrajeron alícuotas de 0,2 ml. que se filtraron a través de membranas filtrantes Gelman GA-6 de $0,45\ \mu\text{M}$ de poro (Gelman Sciences Inc. Michigan, EEUU) y se lavaron inmediatamente 3 veces con 2 ml. de solución amortiguadora ftalato ácido de potasio 20 mM, pH 4,5 a 0°C.

El procedimiento de toma de muestra y filtración de la misma comprendió un lapso no mayor de 5 segundos.

Los filtros se dejaron secar en planchuelas de aluminio y luego fue contada su radiactividad.

2.10.2. Protoplastos.

Se suspendieron protoplastos (aproximadamente 1 mg. de proteínas) en amortiguador ftalato ácido de potasio 20 mM, pH 4,5 conteniendo sorbitol 0,8 M. y se colocaron en tubos cónicos Eppendorf de 1,5 ml. de capacidad a 30°C en baño termostático con agitación constante.

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0,2 ml. incluyendo las distintas adiciones.

Los ensayos de incorporación se iniciaron por el agregado de L- ^{14}C leucina a la mezcla de reacción y al cabo de un determinado intervalo de tiempo la reacción se detuvo por dilución con 1 ml. de sorbitol 1 M. enfriado a 0°C e inmediata centrifugación en centrífuga Eppendorf modelo 5414 (Eppendorf Gerätebau Netheler, Hamburgo, Alemania), durante 1 min.

Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos conteniendo las células se lavaron tres veces con sorbitol 1M. frío antes de determinar su contenido de radiactividad.

En los ensayos en que se estudió el efecto del pH se utilizó la misma solución amortiguadora ajustada al pH que se indica en cada caso.

2.11. Determinación de la radiactividad de las muestras.

2.11.1. Células enteras.

La actividad total de ^{14}C de las muestras retenidas en las membranas filtrantes fue determinada en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic modelo Delta 300 (Tracor Analytic, Illinois, EEUU).

Colocando las membranas en viales con una mezcla centelladora compuesta por: 5 g. de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 50 mg. de p-bis-2-(5-fenil oxazolil benceno) (POPOP) por litro de tolueno p.a.

2.11.2. Protoplastos.

Los sedimentos lavados conteniendo los protoplastos se tomaron 2 veces con 0,25 ml. de solución metanol-agua 9:1 y se transfirieron cuantitativamente a viales conteniendo

5 ml. de líquido de Bray (Bray, 1960) como mezcla centelleadora (PPO 4 g., PCPOP 0,2 g., naftaleno 60 g., etilenglicol 20 ml., metanol 100 ml. y dioxano hasta completar 1 litro).

Las muestras así preparadas se contaron en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic modelo Delta 300.

2.12. Medidas del consumo de oxígeno.

Para las determinaciones del consumo de oxígeno se empleó un oxígrafo de Gilson Medical Electronics (Middletown, Wisconsin, EEUU) modelo K, en cuya celda se colocaron suspensiones de levaduras o protoplastos en condiciones análogas a las empleadas en los ensayos de incorporación de leucina (concentración, pH, temperatura, etc.).

2.13. Determinación de agua intracelular.

Esta determinación se llevó a cabo por el método de Rottenberg (Rottenberg, 1979) con ligeras modificaciones (De la Peña y col. 1982).

Una suspensión celular de 25-30 mg. de peso seco/ml. se incubó a 30°C durante 15 minutos con glucosa 5 mM. en amortiguador italato ácido de potasio 20 mM. pH 4,5. 0,5 ml. de esta suspensión se diluyeron al medio en el mismo amortiguador y se incubaron en presencia de 0,001 ml. de ^{14}C metoxi-metoxi-inulina, New England Nuclear, 33,9 mCi/g., 0,25 mCi/ml. y 0,01 ml. de ^3H - H_2O 2,1 mCi/ml (C.E.A. Francia) a 30°C durante 10 minutos.

Una vez concluida esta incubación se tomaron alícuotas de 0,4 ml que se centrifugaron 1 minuto en centrifuga Eppendorf modelo 5414 (aproximadamente 10.000 xg). El sedimento y el sobrenadante se separaron cuantitativamente, 0,02 ml. de éste y el sedimento en su totalidad se trataron separa-

damente con 1 ml. de dodecil sulfato de sodio 1% durante 24 hs, al cabo de las cuales se determinó el contenido de ^3H y ^{14}C en alícuotas de 0,4 ml., por centelleo líquido con líquido de Bray como solución centelladora.

A partir de estas determinaciones el agua intracelular se calculó según:

$$V_i = V_M \times \left[\frac{{}^3\text{H}_p}{{}^3\text{H}_s} - \frac{{}^{14}\text{C}_p}{{}^{14}\text{C}_s} \right]$$

donde:

V_i = volumen de agua intracelular.

V_M = volumen de muestra empleado.

Los subíndices s y p indican los contenidos de ^3H y ^{14}C en el sobrenadante y precipitado respectivamente.

2.14. Determinación de la incorporación de ácidos débiles, pH intracelular y ΔpH .

La incorporación de ácidos débiles se realizó en condiciones análogas a las descriptas para el estudio de la incorporación de L- ^{14}C leucina en células enteras (amortiguador, filtración, etc.), reemplazando el aminoácido por ácido propiónico o benzoico marcados isotópicamente con las siguientes características:

	Actividad específica	Procedencia
Acido 1- ^{14}C propiónico.	1 mCi/mmol.	C.N.E.A. Bs.As. Argentina.
Acido 2- ^{14}C propiónico.	1 mCi/mmol.	Amersham Int. Inglaterra.
Acido ^{14}C -carboxil benzoico.	0,5 mCi/mmol.	C.E.A. Francia.

En estas determinaciones el filtrado y los lavados se

recogieron en tubos graduados y se cuantificó su radiactividad por centelleo líquido en alícuotas de 0,1 ml. A partir de estos datos se calculó la concentración extracelular del ácido (C_e) y por la radiactividad retenida en las membranas filtrantes se estableció la concentración intracelular del ácido (C_i), considerando que esta radiactividad se halla disuelta en el agua intracelular.

Para el cálculo de la concentración intracelular de protones (H_i^+) se utilizó la siguiente ecuación:

$$[H^+]_i = \left[\frac{C_i}{C_e} \left(\frac{1}{H_e^+} + \frac{1}{K_d} \right) - \frac{1}{K_d} \right]^{-1}$$

donde:

C_i y C_e concentración de especies radiactivas intra y extracelulares respectivamente.

H_e^+ concentración de protones extracelular, determinada por la solución amortiguadora.

K_d constante de disociación del ácido (Se asume que este valor es el mismo dentro y fuera de la célula.

A partir de la concentración intracelular de protones calculada se estableció el pH como $-\log [H^+]_i$.

El gradiente de pH (ΔpH) se calculó como:

$$\Delta pH = pH_i - pH_e$$

donde pH_e corresponde al valor del pH de la solución amortiguadora.

2.15. Diseño experimental.

Para evitar confusión en el uso de ciertos términos y en la interpretación de los resultados obtenidos es conveniente definir lo que se considera valores de unión, trans

locación, entrada e incorporación de leucina.

En todos los casos T_0 es el tiempo de adición de $L-^{14}C$ leucina a la suspensión de células ya, en agitación, en el baño de incubación a $30^\circ C$.

Las muestras que se toman inmediatamente después de T_0 se denominan muestras a T_0 . Estos valores representan los valores de unión del aminoácido a la barrera de permeabilidad.

Las muestras a T_{0+t} se consideran la expresión de otros procesos; si t es mayor de 3 minutos los valores son los de incorporación total del aminoácido y son el resultado de la entrada, acumulación y salida; si t es hasta 3 minutos T_{0+t} corresponde a la entrada, transporte o influjo ya que en ese intervalo no hay eflujo.

T_{0-t} indica el tiempo de una adición previa al agregado de $L-^{14}C$ leucina (preincubación).

En relación con la condición energética de las células, se ha descrito que después de ser cultivadas, éstas se sometieron a ayuno estableciéndose así la condición de "células con baja carga energética" o "ayunadas".

En algunos ensayos estas células ayunadas se incubaron con sustratos oxidables como glucosa 5 mM. o etanol 10 mM., en solución amortiguadora ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5, en baño termostático a $30^\circ C$ durante 15 minutos, estableciéndose el estado de "alta carga energética" o "células energizadas". En estos casos los sustratos empleados en la energización se extrajeron del medio por centrifugación a $4^\circ C$ en centrífuga Sorvall modelo RC-2B durante 5 minutos a 3000 xg. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos conteniendo las células se resuspendieron en agua destilada y se utilizaron inmediatamente en los ensayos de incorpora-

ción descriptos.

2.16. Origen y calidad de las drogas utilizadas.

α -D(+)-glucosa, ftalato de potasio, PPO, tris, EDTA, albúmi
na, D-sorbitol, L-leucina, NEM y FMA; Sigma Chemical Company
St. Louis, EEUU.

POPOP; Nuclear Chicago, Mass. EEUU.

Etilenglicol, etanol y dimetilsulfóxido; E. Merk, Darmstadt,
Alemania.

Extracto de malta, extracto de levadura, peptona y agar; Difco.

DNP; British Drug House Ltd. Londres, Gran Bretaña.

Helicasa; Reactifs IBF, Villeneuve La Garenne, Francia.

GSMAL 1; gentilmente cedida por el Dr. D.Schachter. Univ. de
Columbia, EEUU.

Radiactivos

L- ^{14}C leucina, ácido 1- ^{14}C propiónico y ácido 2- ^{14}C propió-
nico; Amersham International, Gran Bretaña.

^{14}C metoxi-metoxiinulina; New England Nuclear, EEUU.

^3H - H_2O y ácido ^{14}C carboxi-benzoico; C.E.A. Francia.

Todos los demás reactivos fueron de pureza analítica.

RESULTADOS

3. Propiedades del proceso de incorporación en células enteras.

Se ha estudiado la incorporación de L-leucina en levaduras Saccharomyces, las características generales de este proceso y en especial los requerimientos energéticos del mismo.

A este respecto, las levaduras Saccharomyces son organismos que permiten discriminar sistemas generadores de energía localizados en los distintos compartimientos celulares. Esto es consecuencia del metabolismo aeróbico facultativo que se lleva a cabo en estas células en condiciones fisiológicas, procesos aeróbicos y anaeróbicos.

Como en el caso de otros microorganismos, la utilización de cepas mutantes resulta sumamente conveniente para el análisis de distintos mecanismos asociados al metabolismo energético y a la generación y disponibilidad de la energía metabólica requerida para la incorporación de numerosos nutrientes, entre ellos los aminoácidos.

Ensayos realizados en mutantes citoplasmáticas ρ^- , deficientes respiratorias por ausencia de citocromos b y a_{23} , que carecen de una mitocondria funcional y en las cuales la energía proviene de procesos citoplasmáticos, permitieron discriminar entre los efectos producidos por consumo de sustratos de metabolización aeróbica estricta como el etanol y un sustrato como la glucosa que puede ser consumida fisiológicamente en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

En relación con los mecanismos de utilización de los metabolitos producidos en los distintos compartimientos subcelulares, se consideró de sumo interés estudiar el proceso de incorporación en mutantes en que operan los sistemas energéticos en citosol y mitocondria, pero en las cuales la

energía generada en la mitocondria no es utilizada de manera eficiente en el citosol. Para ello se decidió estudiar las propiedades del proceso de incorporación de leucina en una mutante deficiente en el translocador ATP/ADP mitocondrial (mutante Opi). La utilización de esta mutante permitió establecer la relación entre el proceso de incorporación del aminoácido y el metabolismo energético, en condiciones diferentes al caso de las mutantes rho^- , anaeróbicas estrictas, y las cepas silvestres aeróbicas facultativas.

3.1. Las levaduras *S.cerevisiae* cepas JB65 y JB64 incorporan L-leucina.

En la figura 3.1. se observan los resultados del estudio de la incorporación de L-leucina en levaduras de la cepa JB65 y la mutante JB64 en condiciones de baja carga energética intracelular.

Los valores de la incorporación pueden representarse prácticamente en forma lineal y según se desprende de la figura, a los 60 minutos los valores de L-leucina incorporados fueron $0,44 \mu\text{mol/g}$. en la cepa silvestre y en la cepa mutante $0,68 \mu\text{mol/g}$. Si se tiene en cuenta que en estas condiciones experimentales la L-leucina permanece homogéneamente distribuida como tal en el reservorio soluble, y considerando que el volumen de agua intracelular es de $2 \mu\text{l/mg}$. según se describe en Materiales y Métodos, se puede calcular que la concentración intracelular de leucina $0,22 \text{ mM}$. en la cepa silvestre y $0,36 \text{ mM}$ en la cepa mutante, sin considerar que además del aminoácido incorporado las levaduras poseen un reservorio endógeno de L-leucina.

Estos valores no indican que las células hayan llevado

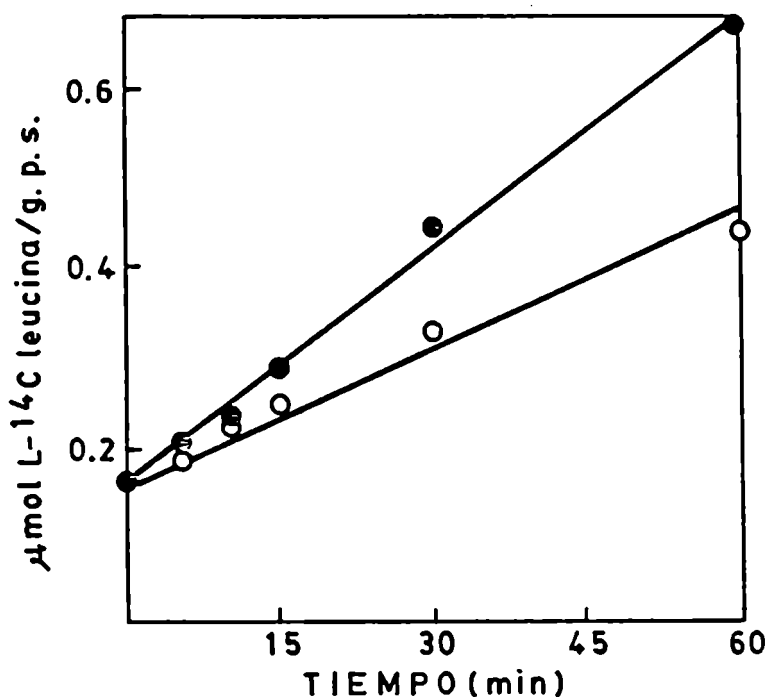


Figura 3.1.: Incorporación de L-leucina en células ayunadas.

Células ayunadas se suspendieron en amortiguador ftalato de potasio 20 mM, pH 4,5 y se incubaron en presencia de L- ^{14}C leucina 0,3 mM. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad. (○) Cepa silvestre JB65. (●) Cepa mutante JB64.

a cabo un proceso de acumulación de L-leucina ya que su concentración en el medio extracelular fue 0,3 mM.

3.2. El consumo de glucosa y etanol estimulan la incorporación de L-leucina.

El efecto del consumo simultáneo de sustratos oxidables sobre la incorporación del aminoácido se observa en la figura 3.2.

A dos concentraciones externas de L-leucina (0,05 mM. y 1,0 mM.) el consumo de glucosa o etanol produjeron un marcado incremento de la incorporación del aminoácido. A la menor concentración de L-leucina externa, figura 3.2.A, los

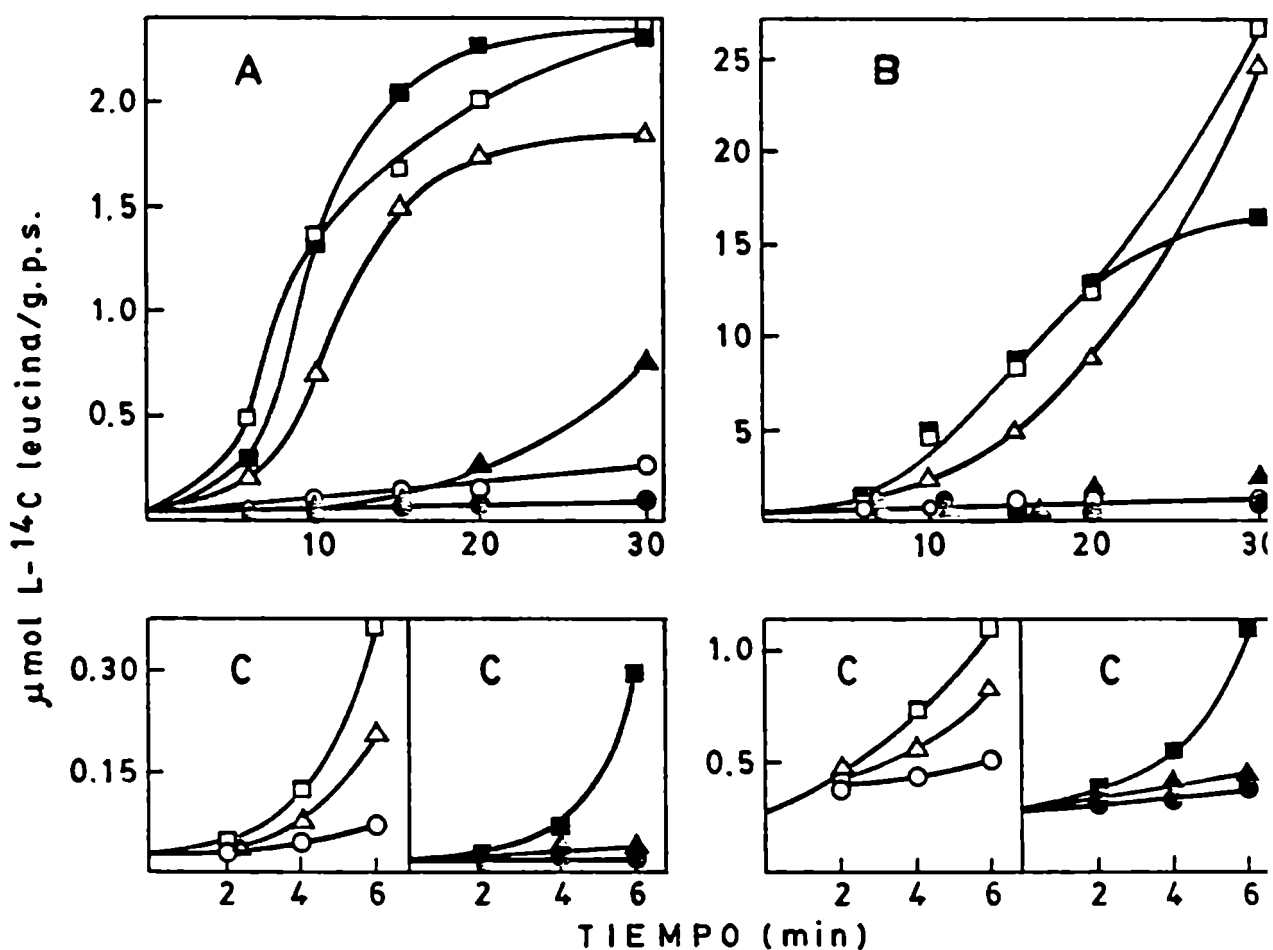


Figura 3.2.: Incorporación de L-leucina en células ayunadas con consumo simultáneo de sustratos.

(A) Células ayunadas se suspendieron en amortiguador ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5 y se incubaron con L-¹⁴C leucina 0,05 mM. en presencia de (\square) D-glucosa 5 mM; (Δ) etanol 10 mM; (\circ) control sin adiciones. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad. Los símbolos abiertos corresponden a la cepa silvestre JB65. Los cerrados a JB64.

(B) Iguales condiciones que en (A) con L-¹⁴C leucina 1,0 mM.

(C) Iguales condiciones que en (A) y (B), detalle a tiempos cortos. Los valores entre paréntesis corresponden a las concentraciones de L-¹⁴C leucina utilizada.

trazados en presencia de glucosa son similares en las dos cepas. En ambos casos, los valores de incorporación alcanzados a los 30 minutos fueron de 2,2-2,3 $\mu\text{mol/g}$. significativamente mayores a los valores hallados en células ayunadas que fueron 0,1 $\mu\text{mol/g}$. en la cepa silvestre JB65 y 0,2 $\mu\text{mol/g}$. en la cepa mutante JB64.

El consumo de etanol mostró diferencias en la incorporación de leucina entre ambas cepas, esto se aprecia en la misma figura. Mientras este consumo permitió alcanzar en la cepa JB65 valores de incorporación de 1,7 $\mu\text{mol/g}$. a los 30 minutos, en el caso de la mutante la incorporación a los 30 minutos fue de 0,7 $\mu\text{mol/g}$.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos por consumo de glucosa, en el caso de la mutante el consumo de etanol produjo sólo un 32% del valor de leucina incorporada en presencia de glucosa, en contraste con el 74% alcanzado en la cepa silvestre.

A la mayor concentración de L-leucina externa ensayada, resultados en la figura 3.2.8, se observó que en casos de levaduras ayunadas la incorporación de L-leucina a 30 minutos fue de 1,0 $\mu\text{mol/g}$. en la cepa silvestre y 0,5 $\mu\text{mol/g}$. en la mutante.

El consumo simultáneo de glucosa produjo un notable incremento de la incorporación de aminoácidos en las dos cepas, alcanzando a los 30 minutos valores de 26,1 $\mu\text{mol/g}$. y 15,5 $\mu\text{mol/g}$. en las cepas silvestre y mutante respectivamente. Con el consumo de etanol en la cepa silvestre se estimuló la incorporación de L-leucina, que alcanzó a los 30 minutos el valor de 23,7 $\mu\text{mol/g}$.; 24 veces mayor que el valor en células ayunadas, en tanto que en la cepa mutante el consumo de etanol permitió que la incorporación de L-leucina alcan-

ce a $2,0 \mu\text{mol/g.}$, valor sólo 4 veces mayor que en células ayunadas. Es interesante señalar que el incremento en los valores de incorporación de leucina, con el consumo simultáneo de sustratos, se pone de manifiesto al cabo de aproximadamente cuatro minutos de incubación de las células con el sustrato como se observa en la figura 3.2.C.

Una comparación entre los resultados obtenidos a tiempos cortos, 6 minutos, permite establecer que en el caso de la cepa silvestre el consumo simultáneo de glucosa produjo una incorporación 5,4 veces mayor que en células ayunadas con la menor concentración de leucina externa ensayada y 2,2 veces mayor a la mayor concentración de aminoácido ensayada.

En la cepa mutante el incremento fue de 10 y 3 veces respecto de las células ayunadas con 0,05 mM. y 10 mM de L-leucina en el medio de ensayo.

El consumo simultáneo de etanol en esas condiciones produjo en la cepa silvestre JB65 incrementos de 3,1 y 1,3 veces con las distintas concentraciones externas ensayadas, siendo este sustrato ineficiente en estimular la incorporación de L-leucina en la cepa mutante JB64.

Por lo tanto, en el caso de la mutante el efecto de la glucosa es comparable al observado en la cepa silvestre, no así el efecto producido por el etanol.

3.3. En levaduras con alta carga energética la incorporación es mayor que en levaduras con baja carga energética.

Los resultados presentados en las figuras 3.2.A-C demuestran que el consumo de sustratos oxidables capaces de generar energía metabólica producen un estímulo en la incorporación del aminoácido y éste se hace más notorio a partir de aproximadamente los 4 minutos.

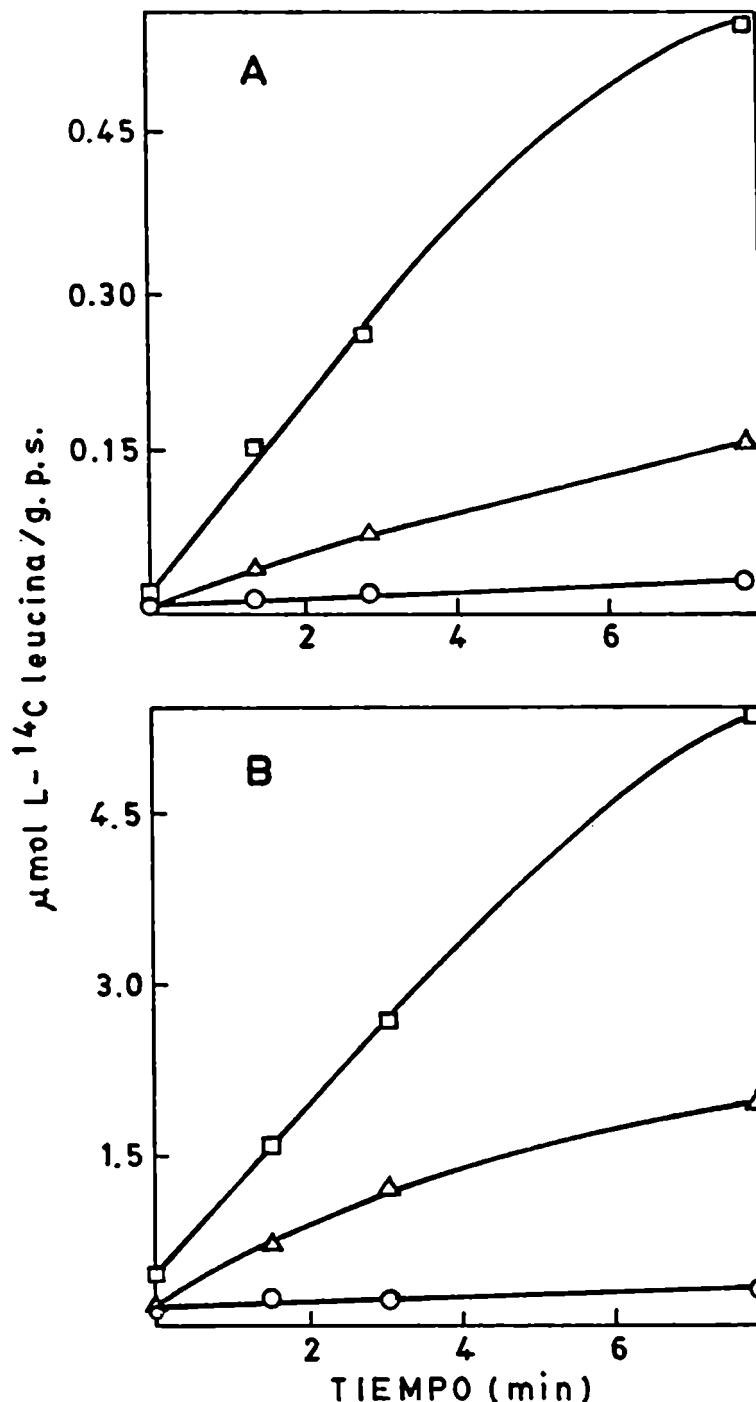


Figura 3.3.: Incorporación de L-leucina en células silvestres energizadas.

(A) Células ayunadas de la cepa silvestre JB05 se preincubaron con (□) D-glucosa 5 mM.; (△) etanol 10 mM.; (○) control sin preincubar, durante 15 minutos en ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5 y luego se incubaron con L-¹⁴C leucina 0,05 mM. en ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5 libre de sustratos oxidables. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para determinar su contenido de radiactividad.

(B) Iguales condiciones que en (A) con L-¹⁴C leucina 1,0 mM.

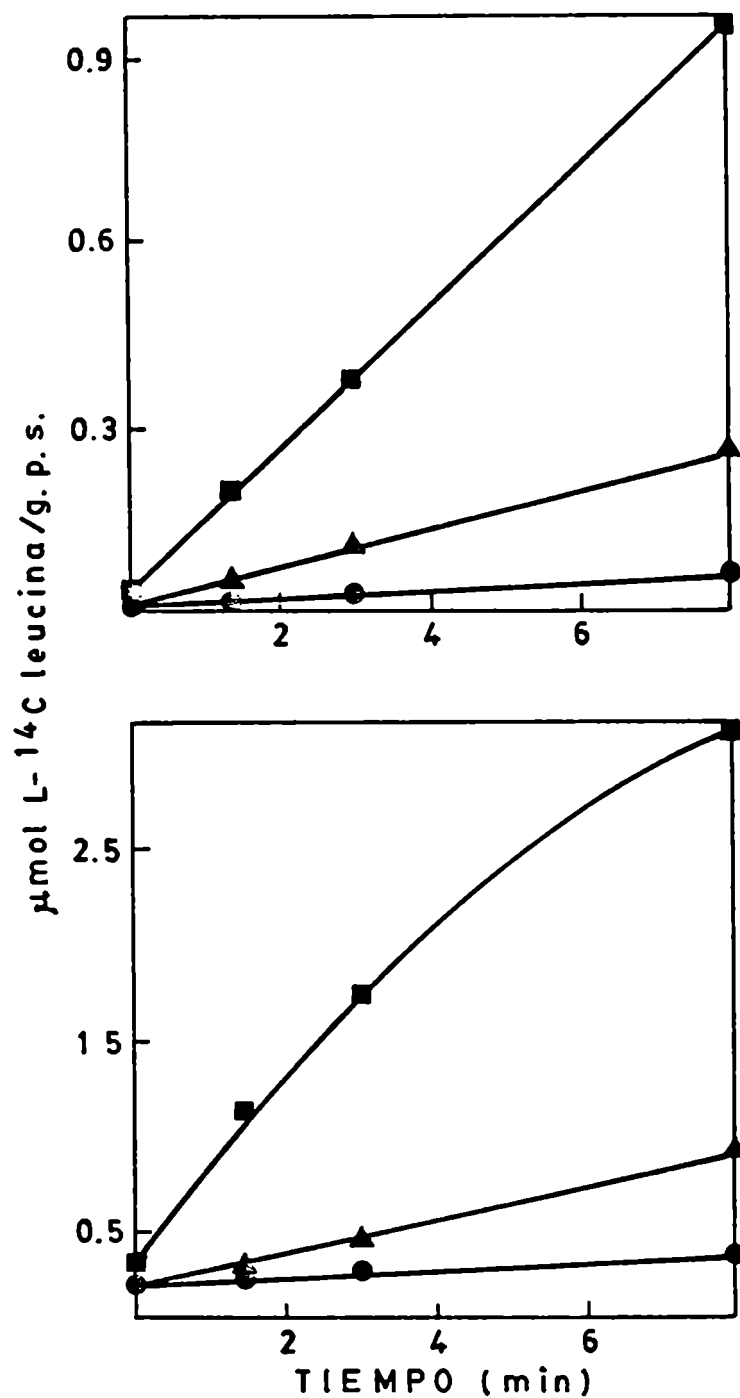


Figura 3.4.: Incorporación de L-leucina en células de la cepa mutante energizadas.

(A) y (B) Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 3.3.A y B respectivamente con células de la cepa mutante JB64.

Es interesante conocer el efecto de la carga energética celular sobre la incorporación, para ello se diseñaron experimentos en que la incorporación se estudió en células con alta carga energética por preincubación con glucosa o etanol. Las células se preincubaron con glucosa 5 mM. o etanol 10 mM. durante 15 minutos, al final de ese intervalo los sustratos fueron extraídos del medio por centrifugación. El tiempo de preincubación y la concentración de sustratos se eligieron a partir de trabajos previos (Ramos y col. 1980). En las figuras 3.3.A y 3.3.B se presentan los resultados obtenidos en estas condiciones con células de la cepa silvestre a concentraciones externas de leucina 0,05 mM y 1,0 mM. respectivamente y en las figuras 3.4.A y 3.4.B se presentan los resultados obtenidos en condiciones análogas con la cepa mutante.

En ambas cepas por preincubación con glucosa o etanol se observaron significativos aumentos de la incorporación del aminoácido. La glucosa produjo un estímulo mayor que el etanol.

3.4. Las células con alta carga energética responden a la presencia de sustratos oxidables en el medio de reacción.

Al estudiar la incorporación de leucina en células con alta carga energética se observó que la adición de glucosa o etanol era capaz de estimular este proceso. En la cepa JB65, figura 3.5. estas adiciones se tradujeron en incrementos significativos de los valores de incorporación observados independientemente del sustrato empleado en la preincubación.

En la cepa mutante, figura 3.6. la incorporación en células preincubadas con glucosa con consumo simultáneo de és-

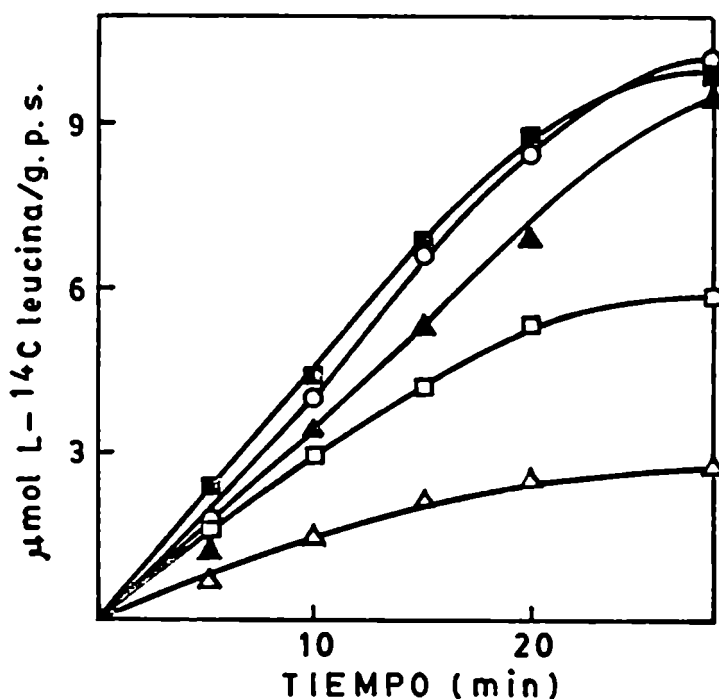


Figura 3.5.: Efecto de la presencia de sustratos oxidables en el medio de incubación sobre la incorporación de L-leucina en células energizadas de la cepa silvestre JB65.

Células ayunadas de la cepa JB65 se energizaron por preincubación con D-glucosa o etanol como se describe en la figura 3.3. Posteriormente se incubaron con L-¹⁴C leucina 0,3 mM. en ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5 en presencia de distintos sustratos, en los tiempos indicados se tomaron a lícotas que se procesaron para determinar su contenido de radiactividad. Los trazados corresponden a: (□) preincubadas con D-glucosa 5 mM.; (△) preincubadas con etanol 10 mM.; (■) preincubadas con D-glucosa 5 mM. y ensayadas con D-glucosa 5 mM. en el medio; (▲) preincubadas con etanol 10 mM y ensayadas en presencia de D-glucosa 5 mM. en el medio y (○) preincubadas con etanol 10 mM. y ensayadas en presencia de etanol 10 mM. en el medio.

ta produjo un incremento inicial de la incorporación que fue disminuyendo en función del tiempo, finalmente los valores de incorporación resultaron similares a los observados en ausencia de glucosa. En células preincubadas con etanol la adición

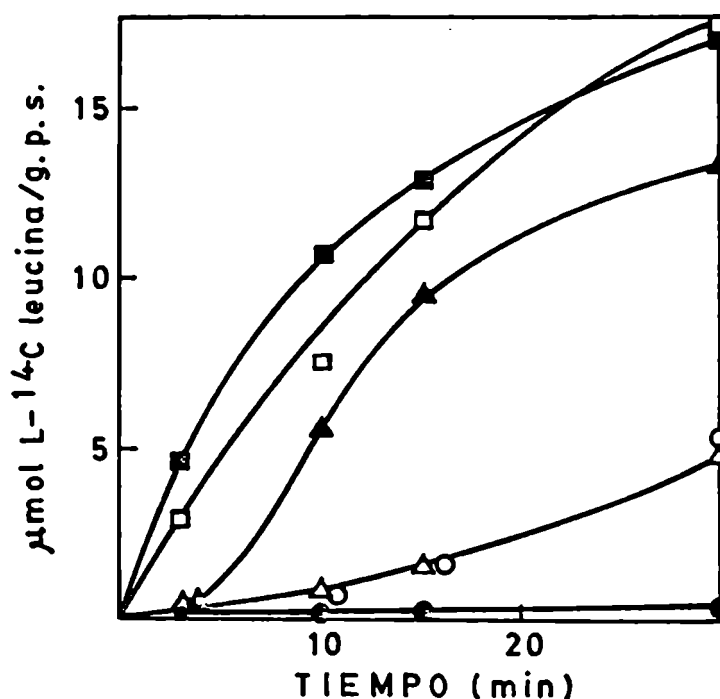


Figura 3.6.: Efecto de la presencia de sustratos oxidables en el medio de incubación sobre la incorporación de L-leucina en células energizadas de la cepa mutante JB64.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 3.5. con células de la cepa mutante JB64.

de glucosa produjo un notable estímulo sobre la incorporación en tanto que la presencia de etanol en el medio de reacción no se tradujo en ninguna modificación de los valores de incorporación.

3.5. El 2,4-dinitrofenol (DNP) inhibe la incorporación de aminoácidos.

En las figuras 3.7. y 3.8. se presentan los resultados con células de las cepas JB65 y JB64, respectivamente, en el estudio del efecto del protonóforo DNP sobre la incorporación de leucina. En ambas cepas se verifican efectos inhibitorios por agregado de DNP 50 μ M. a células ayunadas, preincubadas o ayunadas con consumo simultáneo de sustratos, los resultados fueron similares con leucina 0,05 mM. y 1,0 mM. externa.

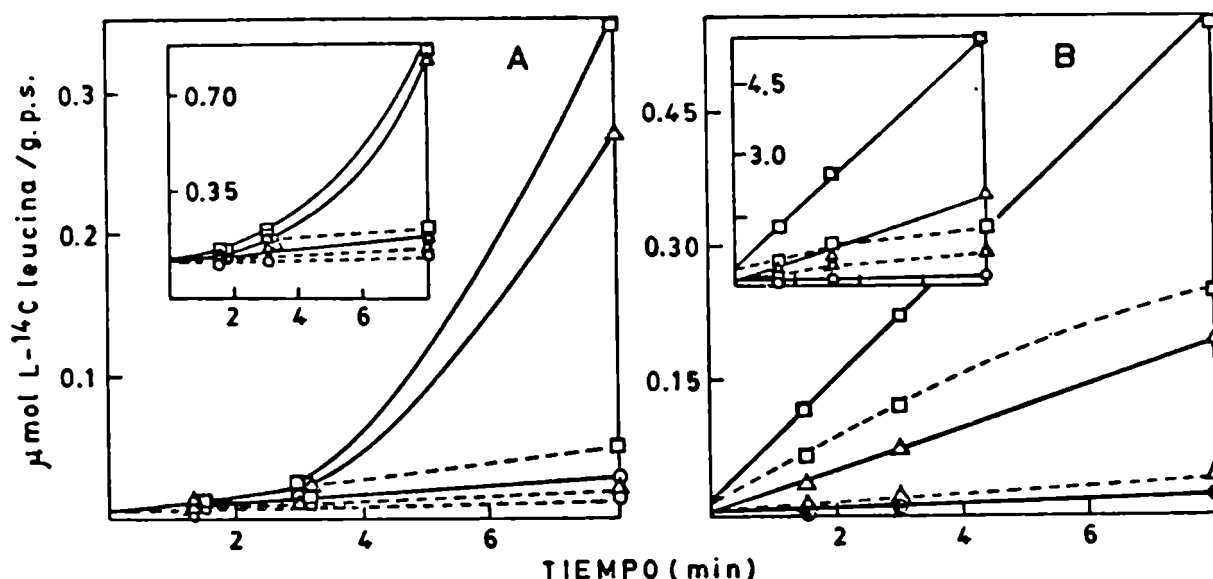


Figura 3.7.: Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la incorporación de L-leucina en células de la cepa silvestre JB65.

(A) Células ayunadas de la cepa JB65 se suspendieron en amortiguador ftalato de potasio 20 mM pH 4,5 y se incubaron con L-¹⁴C leucina 0,05 mM en presencia o ausencia de DNP 0,05 mM y (□) D-glucosa 5 mM. (Δ) etanol 10 mM. o (○) sin fuentes de energía. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad. Los trazados en líneas de puntos corresponden a células tratadas con DNP (agregado a T₀) y los de líneas llenas a células sin DNP. En el recuadro se presentan los resultados obtenidos con L-¹⁴C leucina 1,0 mM.

(B) Células ayunadas (●) o energizadas por preincubación con D-glucosa 5 mM. (□) o etanol 10 mM. (Δ) de la cepa JB65 se suspendieron en amortiguador ftalato de potasio 20 mM pH 4,5 y se incubaron con L-¹⁴C leucina 0,05 mM en presencia o ausencia de DNP 0,05 mM. El resto de las indicaciones corresponden a las descritas en A.

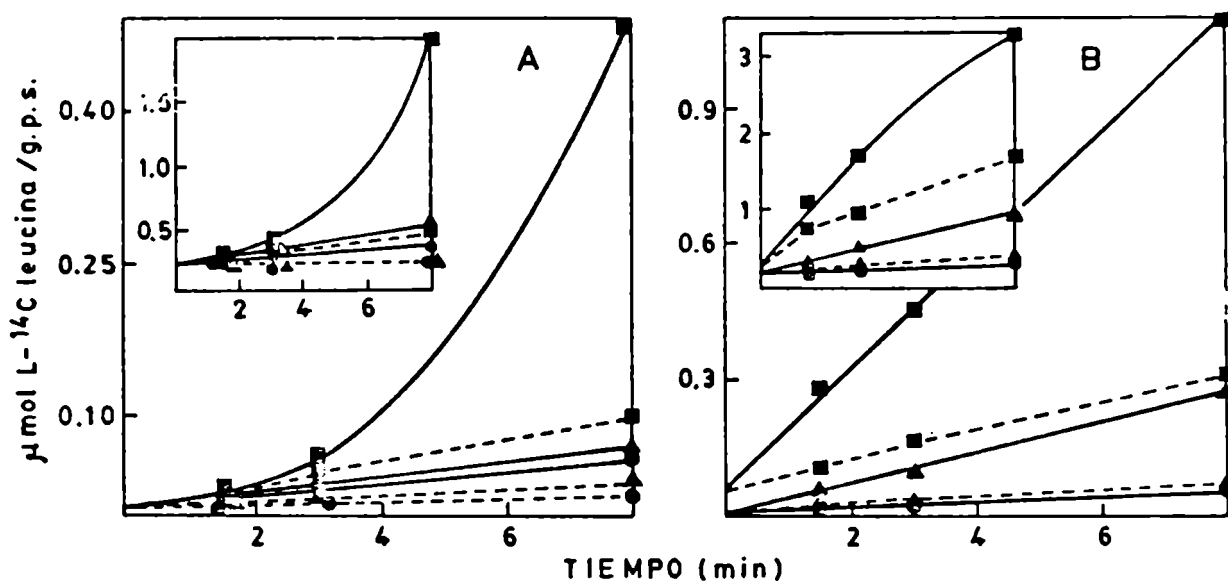


Figura 3.8.: Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la incorporación de L-leucina en células de la cepa mutante JB64.

(A) Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 3.7.A, con células de la cepa mutante JB64.

(B) Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 3.7.B, con células energizadas de la cepa mutante JB64.

La escasa incorporación observada en células ayunadas resultó prácticamente reducida a los valores hallados a T_0 . Asimismo, el estímulo observado por el consumo de etanol o glucosa en la cepa silvestre, o glucosa en la mutante, resultó prácticamente suprimido, figuras 3.7.A y 3.8.A. En el caso de células preincubadas, figuras 3.7.B y 3.8.B, también se produjo una significativa inhibición de la incorporación, obteniéndose en estos casos valores inferiores al 50% de los respectivos controles sin DNP.

4. Propiedades del proceso de entrada en células enteras.

4.1. La medida de la incorporación a tiempos cortos es la medida del proceso de entrada.

En el punto 3. se ha mostrado que la incorporación de L-leucina en células con alta o baja carga energética hasta 4 minutos es lineal, ésta es la medida de la entrada de L-leucina a las células en las que permanece en el reservorio soluble (Ramos y col. 1975).

En las dos cepas estudiadas se observaron diferencias en las velocidades de entrada entre levaduras con baja o alta carga energética; más aún, en este último caso fue posible distinguir un valor de L-leucina a tiempo cero (T_0) proveniente de muestras tomadas inmediatamente después del agregado de L- ^{14}C leucina al medio de reacción.

Los valores a T_0 pueden ser considerados como ligado del aminoácido a la célula y varían significativamente en las células con alta carga energética.

Este "proceso de ligado" depende, presumiblemente, de los sistemas de generación de energía celular, como lo señalan los experimentos con células energizadas por preincubación con glucosa o etanol, que se presentan en la tabla 4.1. para dos concentraciones de L-leucina extracelular.

La preincubación con glucosa produjo un aumento del ligado del aminoácido en las dos cepas con las dos concentraciones de leucina ensayadas. Estos ligados disminuyeron sensiblemente cuando se agregó a las células aminoácido no radiactivo segundos antes que el marcado isotópicamente. Además, en células energizadas con etanol, no se detectaron diferencias en los valores de ligado respecto de las células ayunadas.

Por lo expuesto, dentro del proceso de entrada es posi-

Tabla 4.1.A: EFECTO DE LA PREINCUBACION SOBRE EL LIGADO DE L-LEUCINA. CEPA JB65.

Cepa	L- ¹⁴ C leucina (mM)	Condición metabólica	Adición (T ₀ -5seg.)	Ligado L-leucina (μmol/g.)
JB65	0,05	Ayunada	---	0,014
		Preincubada D-glucosa	---	0,092
		Preincubada D-glucosa	L-leucina 0,5 mM	0,007
		Preincubada etanol	---	0,014
	1,0	Ayunada	---	0,15
		Preincubada D-glucosa	---	0,59
		Preincubada D-glucosa	L-leucina 10 mM	0,06
		Preincubada etanol	---	0,16

Células de la cepa JB65, ayunadas, preincubadas con D-glucosa 5 mM, o preincubadas con etanol 10 mM, se suspendieron en amortiguador ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5 y se incubaron con L-¹⁴C leucina en las concentraciones indicadas. A T₀ se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación del contenido de radioactividad. En los casos en que se especifica T₀-5seg. se agregó al medio de reacción L-leucina no radiactiva.

Tabla 4.1.8: EFECTO DE LA PREINCUBACION SOBRE EL LIGADO DE L-LEUCINA. CEPA JB64.

Cepa	L- ¹⁴ C leucina (mM)	Condición metabólica	Adición (T ₀ -5seg.)	Ligado L-leucina (μmol/g.)
JB64	0,05	Ayunada	---	0,011
		Preincubada D-glucosa	---	0,034
		Preincubada D-glucosa	L-leucina 0,5 mM	0,013
		Preincubada etanol	---	0,010
	1,0	Ayunada	---	0,12
		Preincubada D-glucosa	---	0,21
		Preincubada D-glucosa	L-leucina 10 mM	0,14
		Preincubada etanol	---	0,13

Se siguieron la indicaciones descriptas en la Tabla 4.1.A, con células de la cepa mutante JB64.

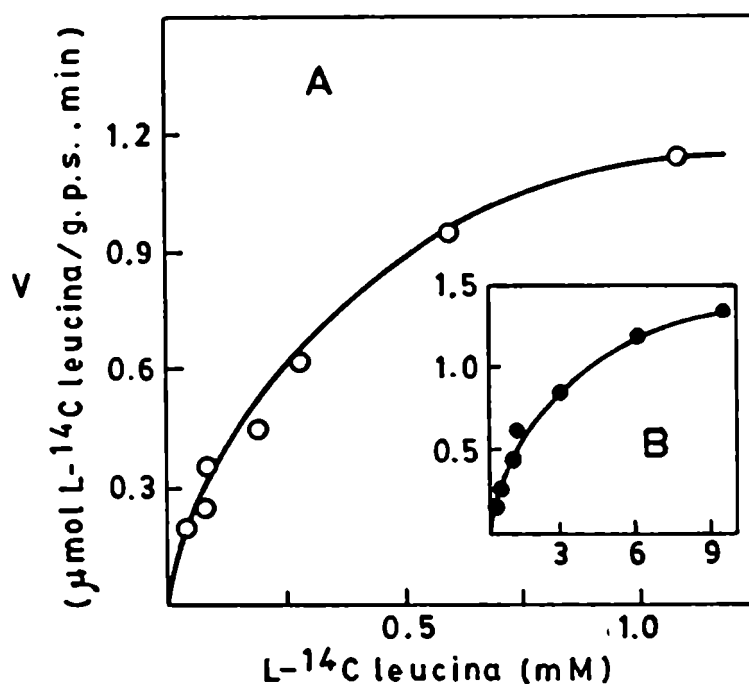


Figura 4.1.: Relación entre la velocidad de translocación de L-leucina y la concentración de aminoácido. Células preincubadas con D-glucosa 5 mM de la cepa JB65 (A) y JB64 (B), se suspendieron en amortiguador ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5 y se incubaron en presencia de L-¹⁴C leucina en las concentraciones indicadas en la absisa. A T₀, T₀+1,5, T₀+3 minutos se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad a partir de las cuales se calcularon las velocidades según se describe en Materiales y Métodos.

ble distinguir una etapa inicial de ligado del aminoácido a la barrera de permeabilidad seguida de otra de translocación a través de la misma.

Los valores de ligado resultan significativos en el caso de células con alta carga energética por preincubación con glucosa.

En la etapa de translocación es posible determinar una velocidad definida como:

$$v = \frac{\text{valores a } T_0+t - \text{valores a } T_0}{t}$$

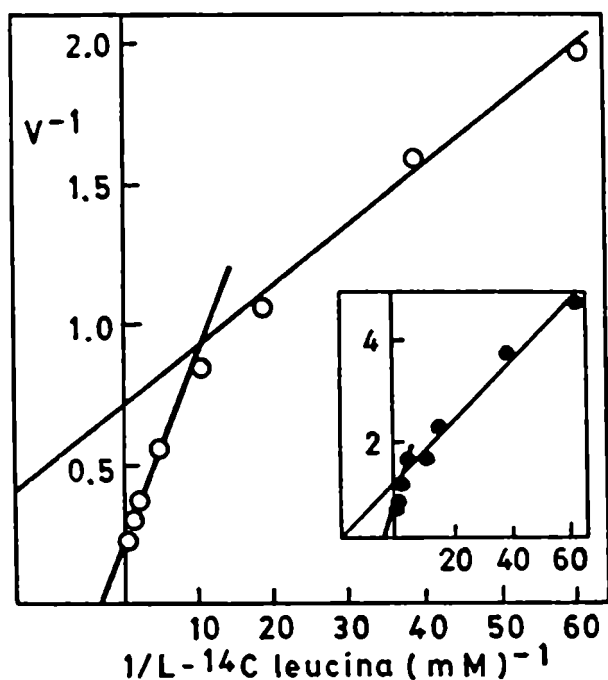


Figura 4.2.: Relación entre la velocidad de translocación de L-leucina y la concentración de aminoácido. Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 4.1.A y B, cepas JB65 y JB64 respectivamente, representándose las inversas según Lineweaver-Burk.

4.2. El estudio cinético de la translocación señala la existencia de dos sistemas.

El análisis cinético de la etapa de translocación de la L-leucina a través de la barrera de permeabilidad, puede hacerse a partir de los resultados presentados en las siguientes figuras. En la figura 4.1. se ha representado la velocidad de translocación, en función de la concentración externa del aminoácido, en células preincubadas con D-glucosa de ambas cepas. Gráficos similares se obtuvieron en las otras condiciones energéticas.

El trazado hiperbólico indica la operación de un proceso saturable en ambas levaduras presente en condiciones de alta y baja carga energética.

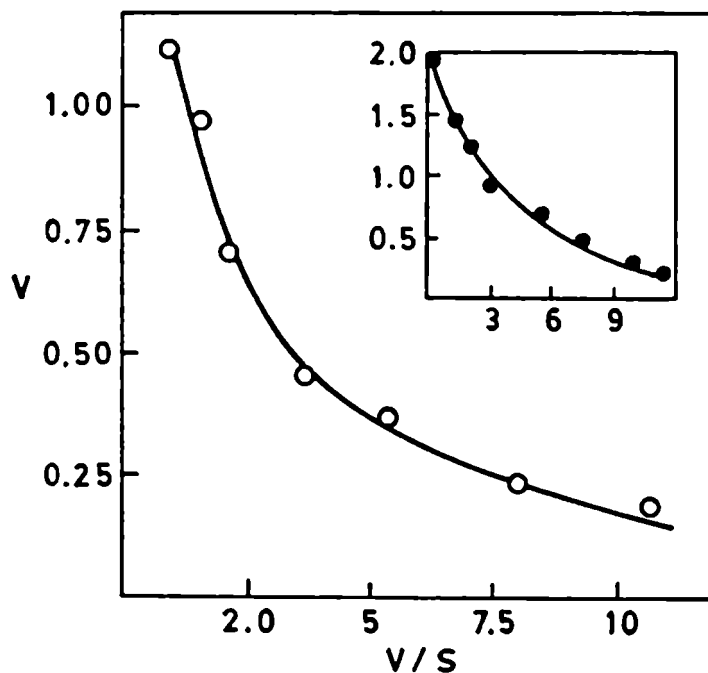


Figura 4.3.: Relación entre la velocidad de translocación de L-leucina y la concentración de aminoácido. Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 4.1.A y B, cepas JB65 y JB64 respectivamente, representándose las datos según Eadie-Hofstee.

La velocidad de translocación está definida por:

$$v = \frac{u}{\Delta t}$$

donde:

v = velocidad

u = cantidad de L-leucina incorporada en el intervalo de tiempo Δt .

Asimismo

$$v = \frac{J_M \cdot S}{K_T + S} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

S = concentración externa de L-leucina.

J_M = influjo máximo.

K_T = concentración de L-leucina para la cual $v = J_M/2$

La ecuación 1 se puede reordenar en:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_T}{J_M} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{J_M} \quad \text{Ecuación 2}$$

o según Eadie Hofstee

$$v = J_M - K_T \cdot \frac{v}{S} \quad \text{Ecuación 3}$$

Tanto en la representación de las inversas según la ecuación 2 presentada en la figura 4.2., como en la de v versus v/S de la figura 4.3., se observan desviaciones de la linealidad indicando la existencia de dos sistemas de translocación cinéticamente caracterizables.

Las figuras 4.2. y 4.3. corresponden a células de las dos cepas en estudio energizadas por preincubación con D-glucosa, el mismo tipo de trazados se obtuvieron con levaduras ayunadas y con alta carga energética por preincubación con etanol.

De estas representaciones fue posible calcular los valores de los parámetros cinéticos K_T y J_M , los cálculos fueron realizados con programa de regresión lineal en calculadora programable Texas Instruments TI 59.

Los valores de los parámetros cinéticos calculados según Lineweaver-Burk, fueron similares a los obtenidos según Eadie Hofstee, esta representación permitió discriminar en forma más apropiada en el rango de las mayores concentraciones utilizadas.

De acuerdo con estos resultados podemos considerar, en el rango de concentraciones estudiadas, la existencia de dos sistemas para la translocación de L-leucina.

Estos sistemas se caracterizan por los valores numéricos de sus parámetros cinéticos y se denominan sistema S_1 de alta afinidad y baja velocidad y sistema S_2 de baja

Tabla 4.11.: EFECTO DEL ESTADO ENERGETICO CELULAR SOBRE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA TRANSLOCACION DE LA L-LEUCINA EN CELULAS DE S.CEREVISIAE. CEPAS JB65 Y JB64.

Cepa	Preincubación (15 min.)	S_1			S_2	
		K_{T1} (mM)	J_{M1} (μ mol/min.g.)	K_{T2} (mM)	J_{M2} (μ mol/min.g.)	
JB65	---	0,024	0,03	0,50	0,09	
	D-glucosa 5 mM	0,042	0,54	0,31	1,27	
	etanol 10 mM	0,046	0,22	0,22	0,40	
JB64	---	0,081	0,01	0,64	0,04	
	D-glucosa 5 mM	0,065	1,21	0,31	2,32	
	etanol 10 mM	0,094	0,26	0,44	0,39	

Los valores se calcularon según las representaciones de las figuras 4.2. y 4.3.

afinidad y alta velocidad.

Los valores obtenidos se presentan en la tabla 4.11. y entre ellos es posible establecer las siguientes relaciones:

- a) Relación entre los valores de parámetros cinéticos y estado energético celular.

Los valores de K_T del sistema S_1 resultan aproximadamente de un orden menor que el del sistema S_2 para una determinada condición energética.

La energización de las células no modifica significativamente los valores de K_T , en cambio los de J_M resultan incrementados. Este incremento resulta mayor por preincubación con glucosa que por preincubación con etanol.

- b) Relación entre los parámetros cinéticos de las células JB65 y JB64.

El incremento de los valores de J_M por energización se observan en las dos cepas en estudio y podría señalarse que los valores de velocidad máxima, por preincubación con D-glucosa, son mayores en la cepa JB64 que en la JB65.

4.3. La L-leucina se une a sitios de la barrera de permeabilidad para ser translocada.

Los resultados ya presentados permitieron señalar la existencia de un proceso de ligado del aminoácido a la barrera de permeabilidad como una etapa perteneciente al proceso general de entrada y este hecho, indica que es necesario el conocimiento de esa etapa para comprender el proceso general.

Por esa razón fue muy importante la cuantificación del aminoácido que unido a la células a T_0 representa el ligado. Experimentalmente corresponde al valor de la incorporación de L-leucina en muestras obtenidas inmediatamente después del

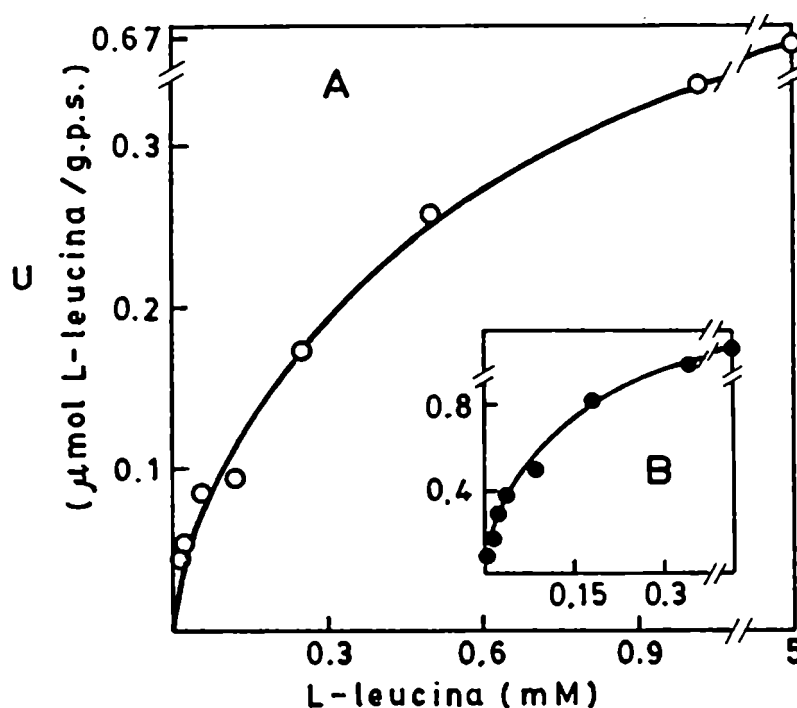


Figura 4.4.: Relación entre el ligado de L-leucina y la concentración de aminoácido.

Células preincubadas con D-glucosa 5 mM, de la cepa JB65 (A) y JB64 (B) se suspendieron en amortiguador italato de potasio 20 mM, pH 4,5 y se incubaron en presencia de L-¹⁴C leucina en las concentraciones indicadas en la absisa. A T₀ se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

agregado del aminoácido a la mezcla de incubación, más aún, en la tabla 4.1. ya descrita, se observaba que los valores de ligado fueron mayores en células de alta carga energética por preincubación con D-glucosa que en células de baja carga energética por ayuno. Sin embargo, en células de alta carga energética por preincubación con etanol los ligados fueron similares a los de células ayunadas.

En la figura 4.4. se presentan los resultados del estudio del efecto de la concentración externa del aminoácido sobre los valores de ligado; dichos valores se incrementan con el aumento en la concentración de aminoácido en forma

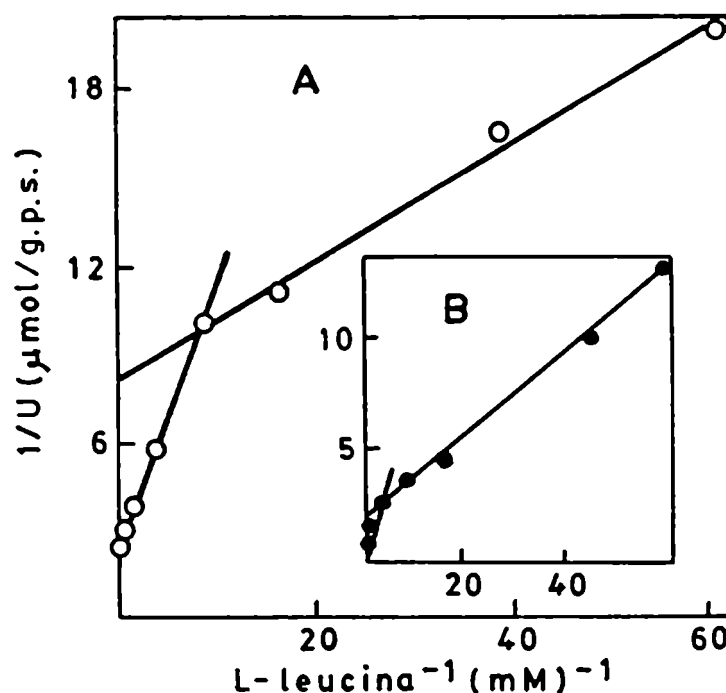


Figura 4.5.: Relación entre el ligado de L-leucina y la concentración de aminoácido.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 4.4.A y B, cepas JB65 y JB64 respectivamente, representándose las inversas según Lineweaver-Burk.

saturante.

La representación de las recíprocas de dichos valores, figura 4.5., como la representación de Scatchard figura 4.6. muestran desviaciones de la linealidad indicando la existencia de dos poblaciones de sitios de ligado para la L-leucina, tanto en la cepa silvestre como la mutante, independientemente de la carga energética celular. Los gráficos presentados corresponden a células energizadas con D-glucosa, estos resultados se pueden extender a las demás condiciones energéticas ya que en ellas se obtuvieron trazados similares.

El cálculo de los parámetros del ligado, N , concentración de sitios de unión y K_d , constante de afinidad, concentración de aminoácidos libre necesaria para alcanzar la mitad

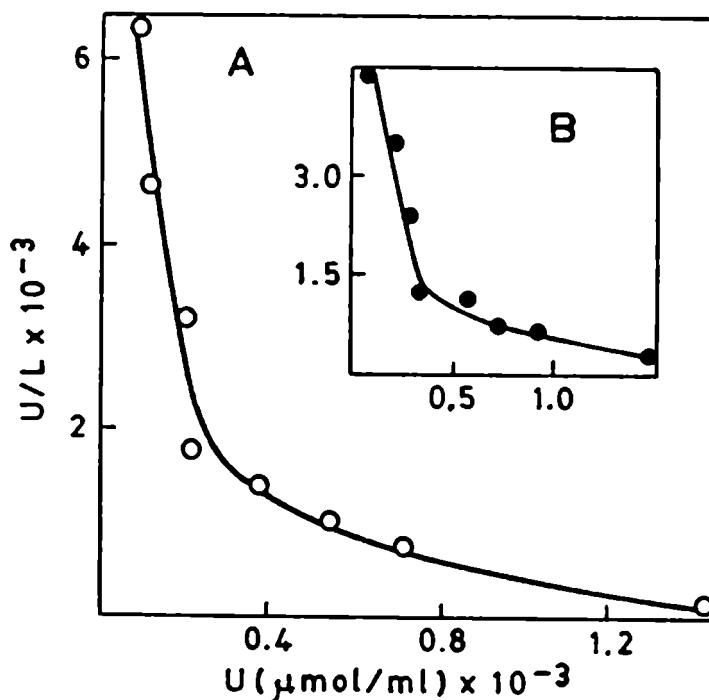


Figura 4.6.: Relación entre el ligado de L-leucina y la concentración de aminoácido.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 4.4. A y B, cepas JB65 y JB64 respectivamente, representándose los datos según Scatchard.

de la saturación de los sitios de unión, permite caracterizar los dos grupos de sitios de unión definidos en las condiciones experimentales estudiadas.

Estos valores se presentan en la tabla 4.11. y permiten establecer las siguientes observaciones:

- a) En células con baja carga energética tanto en levaduras de la cepa JB64, como de la cepa JB65, hay dos poblaciones de sitios de unión. Una designada S_1 por corresponder a las concentraciones externas de aminoácidos, en que opera el sistema de translocación S_1 , y está caracterizada por presentar un número menor de sitios de mayor afinidad por la L-leucina que la otra población, denominada S_2 y definida en el rango de concentraciones externas de L-leucina, donde opera el sistema de translocación S_2 , que posee mayor número de sitios de unión de menor afinidad.

Tabla 4.1111.: EFECTO DEL ESTADO ENERGETICO CELULAR SOBRE LOS PARAMETROS CINETICOS DEL LIGADO DE L-LEUCINA EN CELULAS DE S.CEREVISIAE. CEPAS JB65 Y JB64.

Cepa	Pre incubación	K_{d1} (mM)	N ($\mu\text{mol/g.}$)	K_{d2} (mM)	N_2 ($\mu\text{mol/g.}$)
JB65	---	0,033	0,06	6,60	0,62
	D-glucosa 5 mM	0,026	0,12	0,72	0,64
	etanol 10 mM	0,040	0,04	0,70	0,22
JB64	---	0,250	0,02	5,60	0,24
	D-glucosa 5 mM	0,092	0,34	2,15	0,85
	etanol 10 mM	0,091	0,06	2,96	0,88

Los valores se calcularon según las representaciones de las Figuras 4.5. y 4.6.

- b) En células JB65 y JB64 con alta carga energética por preincubación con D-glucosa o con etanol también hay dos poblaciones de sitios de unión entre las que se establece la misma relación que en a.
- c) En células JB65 la preincubación con D-glucosa promueve la operación de mayor número de sitios activos en el sistema S_1 que mantienen la misma constante K_d . Asimismo el número de sitios de unión del sistema S_2 no varía en estas condiciones pero su K_d disminuye por efecto de la energización, en la cepa JB64, también se observó aumento del número de sitios de unión.

- d) En las células preincubadas con etanol, sustrato que permite una eficiente generación energética en la cepa JB65 pero no en la cepa JB64, se observaron las dos poblaciones de sitios de ligado, sistemas S_1 y S_2 . En estas condiciones, en la levadura JB65 los parámetros del sistema S_1 no varían, es decir, se mantuvieron los valores de los parámetros hallados en células ayunadas.

En el sistema S_2 la constante de afinidad disminuyó significativamente respecto de la condición de ayuno, en forma similar a los provocados por la D-glucosa. En la cepa JB64 se observa un aumento de la afinidad de la misma magnitud que la observada por preincubación con D-glucosa en el sistema S_1 , sin afectar el número de sitios de ligado, el efecto es igual al observado con glucosa.

Estos resultados coinciden con los valores obtenidos en estudios similares realizados en S. carlsbergensis (Wainer 1985).

5. Propiedades del proceso de incorporación en protoplastos.

5.1. Los protoplastos son células de levaduras viables desprovistos de pared celular y consecuentemente del espacio periplasmático.

El estudio de las propiedades de la incorporación de L-leucina en protoplastos de levaduras, con especial interés en el proceso de entrada, tuvo por objetivo establecer la presunta participación de la pared celular y los componentes del espacio periplasmático en este proceso ya que en el caso de los protoplastos la barrera de permeabilidad está constituida solamente por la membrana citoplasmática.

La pared celular fue removida por digestión enzimática, lo que condujo a la liberación al medio extracelular del contenido del espacio periplasmático.

Los protoplastos así preparados, a pesar de que quedan unidos a ellos algunos restos de pared celular, son osmóticamente inestables y por lo tanto altamente sensibles a la presión osmótica de la suspensión que los contiene.

Por ello, para evitar su lisis se los mantuvo en medio con un estabilizador osmótico; sorbitol 0,8 M.

Es posible verificar la viabilidad de los protoplastos e inclusive se puede seguir la regeneración de la pared celular en medios apropiados.

Los protoplastos fueron obtenidos por la técnica descrita en Materiales y Métodos. La transformación de las células en protoplastos osmosensibles, por acción de la enzima Heli-casa, fue verificada por dilución de alícuotas de la mezcla de incubación en H₂O (medio hipoosmótico) o en sorbitol 1 M. (medio isoosmótico) respectivamente. En las diluciones en sorbitol 1 M. no se observó descenso de la densidad óptica en función del tiempo de incubación con la enzima, en cambio en las

Tabla 5.1.: VARIACION DE LA DENSIDAD OPTICA DURANTE LA PREPARACION DE PROTOPLASTOS.

Tiempo (min)	Dilución	D.O.
0	1: 10	1,18
15	1: 10	0,68
30	1: 10	0,48
40	1: 10	0,41

Suspensiones celulares de 10^9 células/ml se incubaron en amortiguador Tris-HCl 0,1 M. pH 8,9 con ditiotreitól 5 mM. a 30°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron y trataron con enzima Helicasa (IBF) en solución estabilizada de sorbitol 1 M. A los tiempos indicados se diluyeron alícuotas de 0,1 ml. de la mezcla de reacción en 0,9 ml. de agua y en éstas se determinó la densidad óptica en un colorímetro Crudo Caamaño.

diluciones en H₂O se observó un perfil de descenso de la densidad óptica causada por la lisis de los protoplastos que se presenta en la tabla 5.1.

Los resultados obtenidos establecieron que a los 40 minutos de incubación el rendimiento de transformación de células en protoplastos fue mayor de 97-98%.

Previo al estudio de la incorporación de L-leucina en protoplastos se consideró la importancia de investigar su viabilidad y verificar que éstos estuvieran libres de pared celular.

Para confirmar que las células así obtenidas son protoplastos carentes de pared celular, se realizó la coloración de ácido peryódico de Schiff (PAS), la que permite detectar restos de pared celular, el reactivo reacciona con grupos polialcólicos de los carbohidratos de la pared celular con producción de una intensa coloración roja. La observación

microscópica de preparados de protoplastos, en contraste con las levaduras enteras teñidas de rojo intenso, mostraron células con una débil coloración rosa, demostrando la ausencia de pared celular.

Además, no se detectaron células teñidas en los preparados de protoplastos confirmando el alto grado de eficiencia conseguida en la transformación.

Con respecto a la viabilidad de los protoplastos, suspensiones de éstos en estabilizador osmótico se trataron con el colorante vital azul de trypan con la técnica descrita en Materiales y Métodos. En muestras tomadas de las preparaciones no se observaron células teñidas, mientras que alícuotas calentadas a 80°C durante 10 minutos, presentaron una alta proporción de células coloreadas. Con estos protoplastos, libres de pared celular y viables se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

5.2. Los protoplastos incorporan L-leucina en función del tiempo.

Se estudió la incorporación de L-leucina en protoplastos usando la técnica descrita en Materiales y Métodos. Las condiciones experimentales de la mencionada técnica fueron las determinadas en experimentos previos realizados con el fin de obtener resultados reproducibles. Entre los ensayos realizados se probaron técnicas de separación de protoplastos del medio de reacción por filtración a través de filtros de nitrocelulosa ó por centrifugación rápida en centrífuga Eppendorf, determinación de la concentración de protoplastos apropiada para ensayos de incorporación, concentración del estabilizador osmótico que asegura la integridad de los protoplastos para una correcta incorporación de

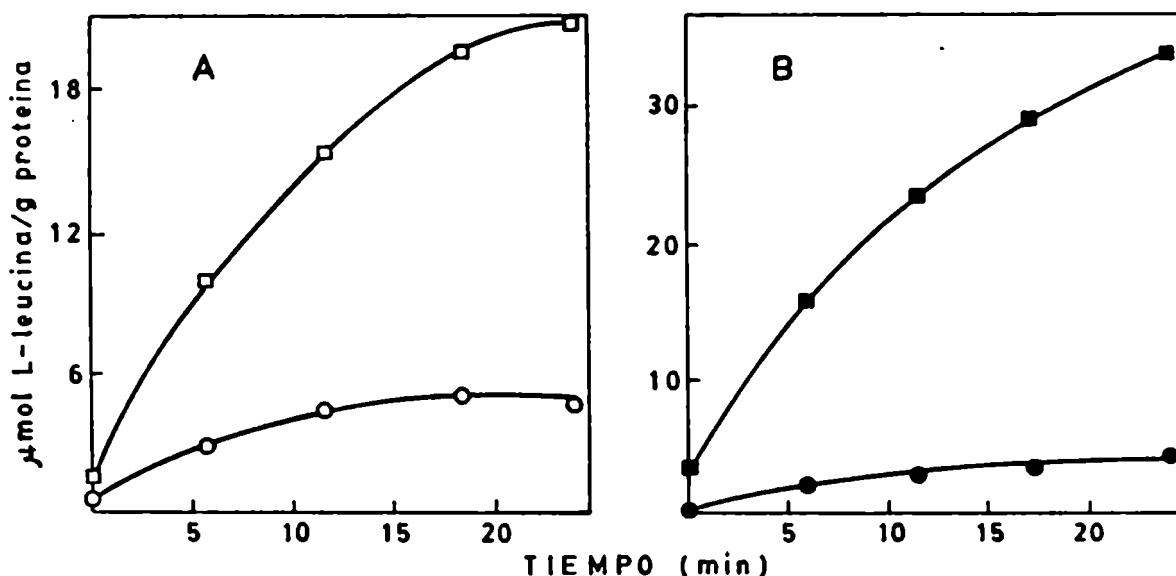


Figura 5.1.: Incorporación de L-leucina en protoplastos de levadura.

(A) Protoplastos de la cepa JB65 suspendidos en sorbitol 0,8 M. se preincubaron con D-glucosa 5 mM. durante 15 minutos en amortiguador ftalato de potasio 20 mM. pH 4.5. Posteriormente se centrifugaron y resuspendieron en sorbitol 0,8 M., ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5 y se incubaron en presencia de L-¹⁴C leucina 0,05 mM (○) y 1,0 mM. (□). A los tiempos indicados se extrajeron alícuotas que se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad intracelular.

(B) Se siguieron las indicaciones descritas en A en protoplastos de la cepa JB64. (●) L-¹⁴C leucina 0,05 mM. (■) L-¹⁴C leucina 1,0 mM.

L-leucina y la adaptación de la técnica para una eficiente medida del ¹⁴C por centelleo líquido.

La medida de la incorporación de L-leucina se realizó en protoplastos de las cepas JB65 y JB64 energizadas por preincubación con D-glucosa.

Los resultados obtenidos en la determinación de L-leucina a distintas concentraciones externas del aminoácido se observan en la figura 5.1.A y B. A concentración externa 0,05 mM. el sistema alcanza un estado de equilibrio a partir de los 12 minutos siendo los valores de incorporación similares en ambas cepas. Con la concentración externa 1 mM. la incorporación tiende a un estado de equilibrio.

En todos los casos la velocidad de incorporación disminuye con el tiempo.

5.3. La incorporación a tiempos cortos es la medida de la entrada. Se distingue una etapa de ligado y otra de translocación.

Como en el caso de las levaduras enteras la medida de la incorporación hasta 5 minutos corresponde a los valores de entrada,

En la figura 5.2. se puede apreciar como los valores graficados de L-leucina incorporada en las células de las cepas JB65 y JB64 determinan una línea recta, cuya ordenada al origen resulta distinta de cero. Los valores a T_0 son los que corresponden al ligado del aminoácido a la membrana citoplasmática, es decir, que en el caso de la incorporación en protoplastos, como en células enteras, se puede considerar una etapa de ligado a la membrana citoplasmática y otra de translocación a través de ella.

5.4. El estudio cinético de la translocación en protoplastos señala la existencia de dos sistemas.

El estudio de la velocidad de translocación, en función de la concentración externa del aminoácido, permitió observar que la translocación es un proceso saturable como se muestra

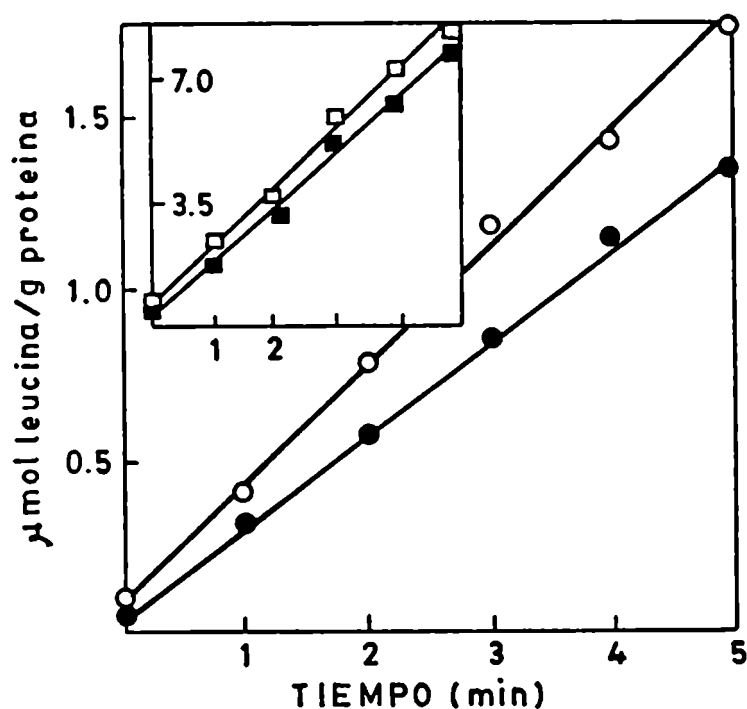


Figura 5.2.: Incorporación de L-leucina en protoplastos a tiempos cortos de incubación.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 5.1. Los símbolos abiertos corresponden a la cepa silvestre JB65 y los cerrados a la cepa mutante JB64. (○) L-¹⁴C leucina 0,05 mM (□) L-¹⁴C leucina 1,0 mM.

en la figura 5.3.

El tratamiento cinético de los datos, realizados con la metodología empleada en células enteras, permitió describir la existencia de dos sistemas cinéticamente distinguibles, el sistema S_1 y el sistema S_2 , según se desprende de las figuras 5.4. con los trazados de Lineweaver-Burk y 5.5. con los de Hofstee. En la tabla 5.11. se presentan los valores de los parámetros cinéticos de la translocación; en ella se observa, en concordancia con células enteras, la existencia de un sistema S_1 , de mayor afinidad y menor velocidad máxima, y un sistema S_2 de menor afinidad y mayor velocidad máxima. Los valores de K_T de los dos sistemas difieren entre

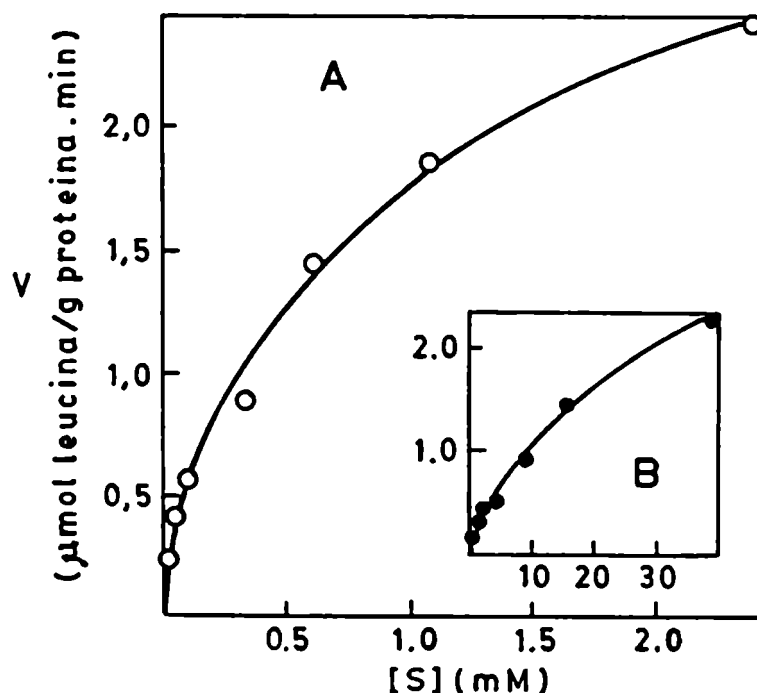


Figura 5.3.: Relación entre la velocidad de translocación de L-leucina en protoplastos y la concentración de aminoácido.

Protoplastos de las cepas JB05 (A) y JB04 (B), energizados por preincubación con D-glucosa 5 mM, se suspendieron en ftalato de potasio 20 mM, sorbitol 0,8 M, y se incubaron con L- 14 C leucina en las concentraciones indicadas en la abscisa. A T₀, T₀+1,5 minutos y T₀+3 minutos se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad. A partir de las cuales se calcularon las velocidades según se describe en Materiales y Métodos.

si prácticamente en un orden de magnitud.

5.5. La L-leucina se une a sitios de la membrana citoplasmática para ser translocada.

El estudio de los valores de ligado en protoplastos, en función de la concentración externa de aminoácido, se realizó en forma análoga al llevado a cabo con células enteras con la diferencia de que las muestras se obtuvieron por dilución

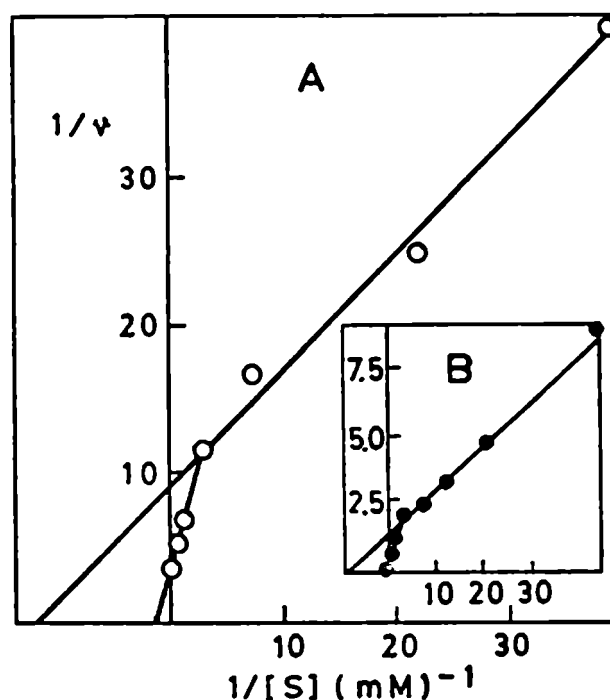


Figura 5.4.: Relación entre la velocidad de translocación de L-leucina en protoplastos y la concentración de aminoácido.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 5.3.A y B, cepas JB65 y JB64 respectivamente, representándose las inversas según Lineweaver-Burk.

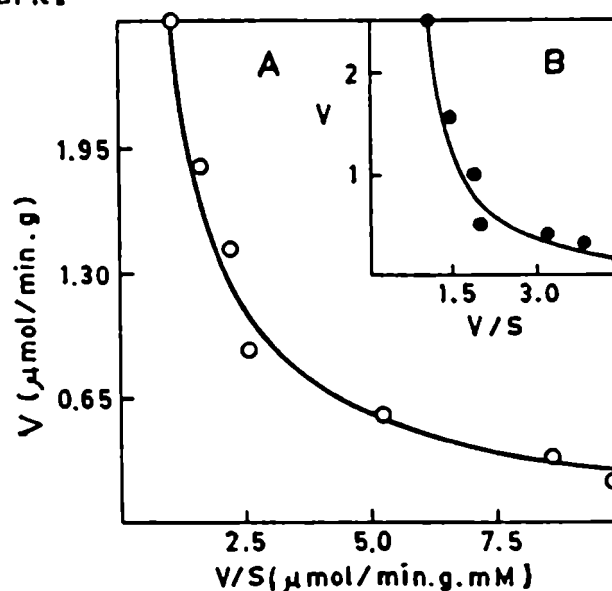


Figura 5.5.: Relación entre la velocidad de translocación de L-leucina en protoplastos y la concentración de aminoácido.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 5.3.A y B, cepas JB65 y JB64 respectivamente, representándose los datos según Eadie-Hofstee.

Tabla 5.11.: PARAMETROS CINETICOS DE LA TRANSLOCACION DE L-LEUCINA EN PROTOPLASTOS DE LEVADURA S.CEREVISIAE CON ALTA CARGA ENERGETICA. CEPA SILVESTRE JB65 Y MUTANTE JB64.

Cepa	S_1		S_2	
	K_{T1} (mM)	J_{M1} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)	K_{T2} (mM)	J_{M2} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)
JB65	0,084	1,06	0,93	3,77
JB64	0,170	1,46	1,16	3,59

Los valores se calcularon según las representaciones de las figuras 5.4. y 5.5.

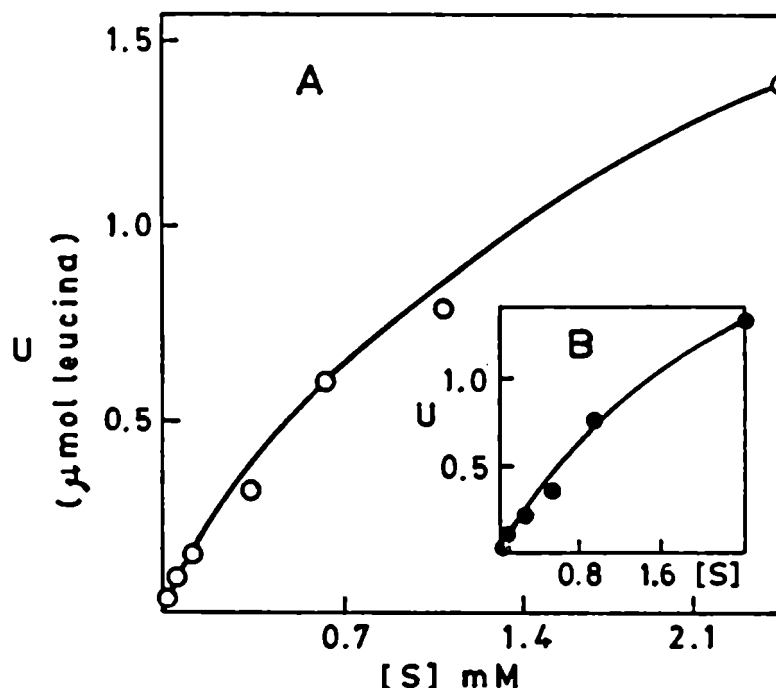


Figura 5.6.: Relación entre el ligado de L-leucina en protoplastos de levadura y la concentración de aminoácido.

Protoplastos de las cepas JB65 (A) y JB64 (B), energizados por preincubación con D-glucosa 5 mM. se suspendieron en ftalato de potasio 20 mM, pH 4,5, sorbitol 0,8 M. y se incubaron con L- ^{14}C leucina en las concentraciones indicadas en las absisas. A T_0 se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

en medio isoosmótico e inmediata centrifugación y no por filtración según se indica en Materiales y Métodos.

En la figura 5.6. se presentan los datos de ligado en función de la concentración del aminoácido, en la figura 5.7. el gráfico de Lineweaver-Burk y en la figura 5.8. la representación de Scatchard.

Como en el caso de las levaduras enteras, los datos indican la existencia de dos tipos de poblaciones de sitios de unión cuyos parámetros K_{d1} , K_{d2} , N_1 y N_2 se presentan en

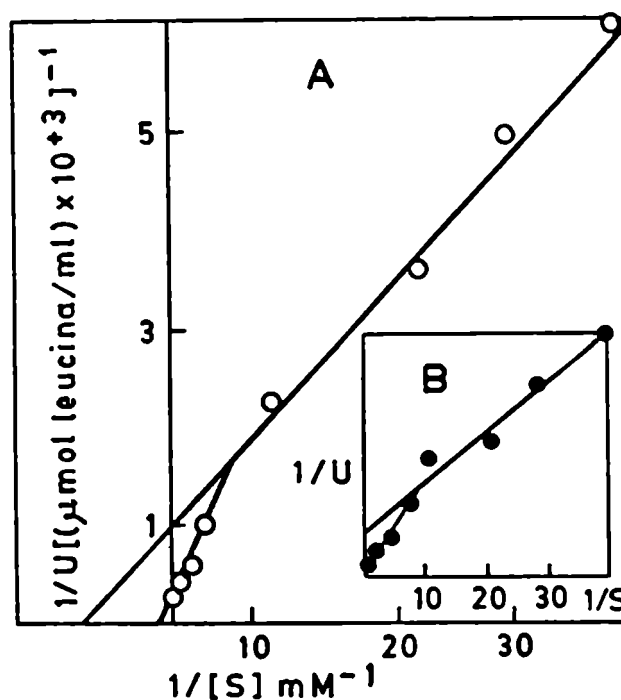


Figura 5.7.: Relación entre el ligado de L-leucina en proto-
plastos de levadura y la concentración de ami-
noácido.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 5.6.A y B, cepas JB05 y JB04 respectivamente, representándose las inversas según Lineweaver-Burk.

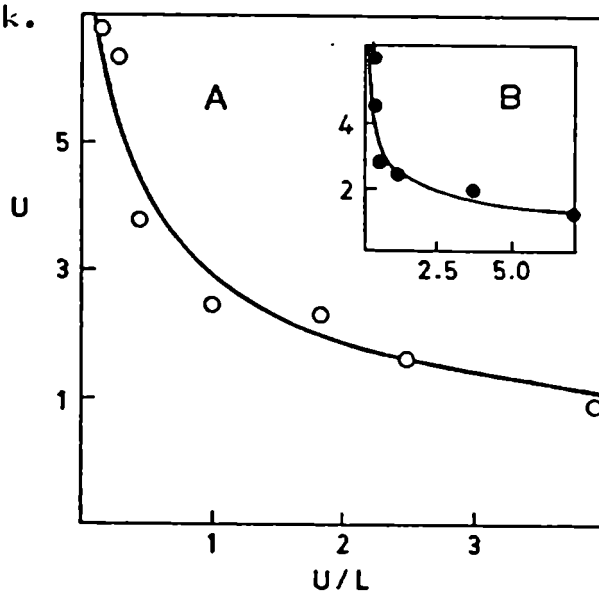


Figura 5.8.: Relación entre el ligado de L-leucina en proto-
plastos de levadura y la concentración de ami-
noácido.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 5.6.A y B, cepas JB05 y JB04 respectivamente, representándose los datos según Scatchard.

Tabla 5.III.: PARAMETROS DEL LIGADO DE L-LEUCINA EN PROTOPLASTOS DE LEVADURA.

Cepa	Método analítico	K _{d1} (mM)	N ₁ (μ mol/g.)	K _{d2} (mM)	N ₂ (μ mol/g.)
JB65	DR	0,12	0,42	2,24	2,87
	S	0,13	0,45	2,15	2,80
JB64	DR	0,22	0,32	6,56	3,01
	S	0,20	0,35	6,50	3,01

Los valores se calcularon según las representaciones de las figuras 5.7 y 5.8.

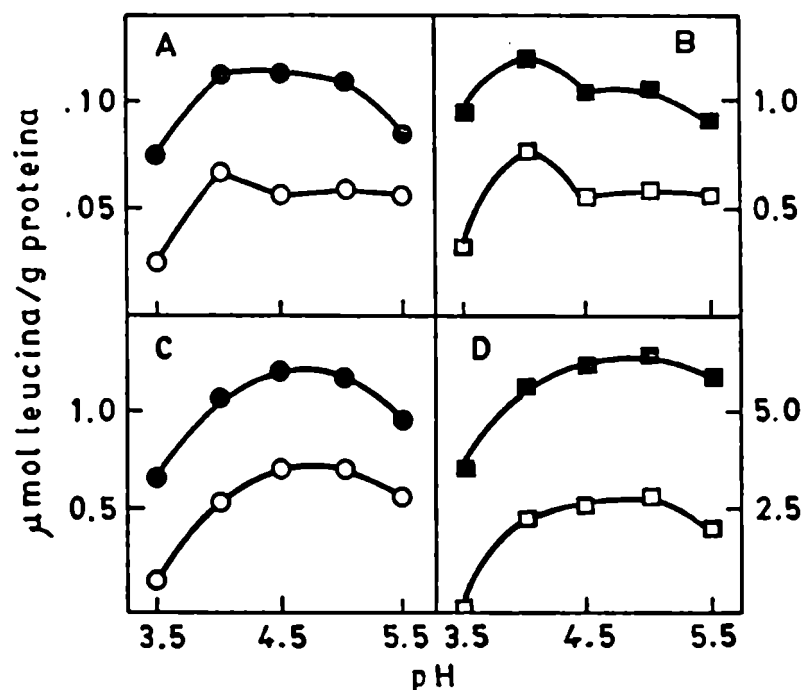


Figura 5.9.: Efecto del pH sobre la entrada de L-leucina en protoplastos de levadura.

Se siguieron las indicaciones descriptas en la figura 5.1. excepto que las incubaciones en presencia de L- ^{14}C leucina se llevaron a cabo en ftalato de potasio 20 mM. ajustado al pH indicado en cada caso. Los símbolos abiertos corresponden a la cepa silvestre JB65 y los cerrados a la cepa mutante JB64, (○) L- ^{14}C leucina 0,05 mM. (□) L- ^{14}C leucina 1,0 mM.

(A) y (B): Las muestras se tomaron a T_0 .

(C) y (D): Las muestras se tomaron a $T_0+3\text{min}$ y los valores representados corresponden a $(T_{0+3\text{min}}) - T_0 = T_t$.

la tabla 5. III.

En la tabla se observa que los valores obtenidos por ambos métodos analíticos son semejantes, siendo los del sistema S₁ prácticamente un orden menor que los del sistema S₂.

5.6. La incorporación de L-leucina en protoplastos es sensible al pH extracelular.

El efecto del pH sobre la incorporación de L-leucina en protoplastos se estudió ajustando el amortiguador ftalato de potasio a distintos valores de pH entre 3,5 y 5,5.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5.9. en ella se discriminan los efectos observados sobre el ligado y translocación para concentraciones extracelulares de aminoácido 0,05 mM. y 1,0 mM.

La respuesta observada fue similar en ambas cepas. Las variaciones de pH entre 4,5 y 5,5, no produjeron modificaciones significativas en los valores de ligado para ninguna de las concentraciones ensayadas, observándose un máximo a pH 4 y una caída a valores inferiores a éste.

La translocación presentó valores máximos en el rango de pH 4,5 y 5 para la menor concentración de L-leucina utilizada, extendiéndose este rango hasta 4 para L-leucina 1,0 mM. A pH 3,5 la translocación del aminoácido resultó significativamente disminuida.

5.7. Comparación entre células enteras y protoplastos.

Resultados presentados por distintos grupos de trabajo han señalado que la comparación, entre los valores de los parámetros cinéticos de la translocación y/o del ligado entre células enteras y protoplastos (Jeanjean y col. 1982, Nishimura y col. 1982) o células enteras y células sometidas a choque osmótico (Wainer, 1985), permite discriminar acerca de la posible participación de componentes de la pared celular, del espacio periplasmático y de la membrana citoplasmática en el proceso de transporte.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en células y en protoplastos en condiciones análogas, los datos correspondientes a los valores de sus parámetros se presentan en la tabla 5.IV. para la translocación y en la tabla 5.V. para el ligado, expresando los valores de J_M y N en $\mu\text{moles de L-leucina}/10^{11}$ células, tanto para células enteras como para protoplastos.

Los datos de la tabla 5.IV. muestran que los valores determinantes de las constantes de afinidad, en ambos sistemas y en ambas levaduras, fueron menores en células que en protoplastos, pero esa diferencia no puede considerarse como significativa. Paralelamente, las velocidades máximas de células y protoplastos fueron similares en ambas cepas, hecho que sugiere que los componentes del sistema responsable de estos parámetros se hallan firmemente ligados a la membrana citoplasmática.

Diferente es el panorama cuando se comparan los datos obtenidos en el ligado. En este caso la constante de afinidad, en particular las del sistema S_1 , son mayores en protoplastos que en células enteras, lo que implica una pérdida de afinidad del sistema de ligado por el aminoácido.

Esta observación coincide con sugerencias previas (Wainer 1985) respecto de la existencia de algún componente de dicho sistema cuya pérdida afecta la afinidad del sustrato por el sitio de reconocimiento.

Tabla 5.IV.: COMPARACION DE LOS PARAMETROS DE TRANSLOCACION DE L-LEUCINA EN CELULAS ENTERAS Y PROTOPLASTOS DE LEVADURA S.CEREVISIAE.

Cepa		K _{T1} (mM)	$\frac{J_{M1}}{10^{11} \text{ cel}}$ ($\mu\text{mol}/10^{11} \text{ cel}$)	K _{T2} (mM)	$\frac{J_{M2}}{10^{11} \text{ cel}}$ ($\mu\text{mol}/10^{11} \text{ cel}$)
JB65	Protoplastos	0,084	0,41	0,93	1,42
	Células	0,042	0,67	0,31	1,58
JB64	Protoplastos	0,170	1,49	1,16	3,66
	Células	0,065	1,99	0,31	3,82

Los valores se calcularon según las representaciones de las figuras 4.2., 4.3., 5.3. y 5.4.

Tabla 5.V.: COMPARACION DE LOS PARAMETROS DEL LICADO DE L-LEUCINA EN CELULAS ENTERAS Y PROTOPLASTOS DE LEVADURA S.CEREVISIAE.

Cepa		K_{d1} (ml)	N_{111} ($\mu\text{mol}/10^{11}$ cel)	K_{d2} (ml)	N_{211} ($\mu\text{mol}/10^{11}$ cel)
JB65	Protoplastos	0,127	0,17	2,15	1,06
	Células	0,029	0,15	0,83	0,80
JB64	Protoplastos	0,261	0,35	4,33	2,50
	Células	0,075	0,37	2,15	1,39

Los valores se calcularon según las representaciones de las figuras 4.5, 4.6., 5.7. y 5.8.

6. Los reactivos de grupos tioles permiten investigar la localización de los sistemas de transporte.

Con el objeto de investigar la localización de componentes de los sistemas de transporte de leucina que participan en los mecanismos de entrada y de translocación del aminoácido y obtener a partir de éstos la posibilidad de distinguir los sistemas caracterizados, se estudió el efecto de reactivos de grupos tioles de distinta penetración en la barrera de permeabilidad. Además utilizando concentraciones extracelulares de L-¹⁴C leucina 0,05 mM. y 1,0 mM., concentraciones en las cuales operan los sistemas S₁ y S₂ respectivamente, se estudiaron diferencias funcionales existentes entre ambos.

Los reactivos de grupos tioles fueron utilizados por numerosos grupos de investigación que establecieron la participación funcional de grupos tioles en procesos de transporte de distintos sustratos en organismos procariotes (Fox y Kennedy, 1965; Fox, 1969; Janick y col. 1977) y eucariotes (Takadera y Mohri, 1983; Young, 1980; Ramos y col. 1983) y su posible relación con la variación del potencial de membrana (Cohn y col. 1981; Robillard y Lageveen, 1983).

En general, todos los ensayos se orientaron a discriminar entre grupos tioles localizados en distintos entornos proteicos de los sistemas S₁ y S₂ mediante el empleo de reactivos de distinta solubilidad, reactivos hidrosolubles ó liposolubles y su relación con la barrera de permeabilidad mediante el uso de reactivos estrictamente no penetrantes al espacio intracelular.

Su utilización en células enteras y protoplastos permite discriminar la participación de grupos tioles presentes en proteínas del espacio periplasmático o la pared celular.

De acuerdo a lo expuesto los reactivos empleados fueron los siguientes:

- a) N-etilmaleimida (NEM), de rápida penetrabilidad en la célula.
- b) N-fenilmaleimida (NFM), un derivado de maleimida más hidrofóbico que la NEM.
- c) Glutation maleimida I (GSMAL I), derivado de maleimida que no penetra en la célula (Abbott y Schachter, 1976).
- d) Acido fluoresceín mercuriacético (FMA) reactivo de grupos tioles con afinidad por grupos localizados en entornos hidrofílicos.

Todos los ensayos se realizaron con células con alta carga energética por preincubación con D-glucosa.

6.1. La entrada de L-leucina es sensible a N-etilmaleimida (NEM), sus efectos no resultan modificados por el ditiotreitól (DTT).

6.1.1. Ensayos en protoplastos

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de concentraciones crecientes de NEM sobre el transporte de L-leucina se presentan en la figura 6.1. Se observa que en las dos cepas estudiadas las mayores concentraciones de NEM inhibieron parcialmente tanto el ligado como la translocación del aminoácido, por el contrario la NEM en concentración 10^{-4} M. estimuló la translocación, siendo el sistema S_1 más sensible que el sistema S_2 . Es conveniente indicar que en distintos experimentos los valores de estimulación presentaron variaciones que oscilaron entre 20% y 60% de estímulo respecto del control, en todos los casos el efecto en la cepa silvestre JB65 (figura 6.1.A) fue mayor que en la

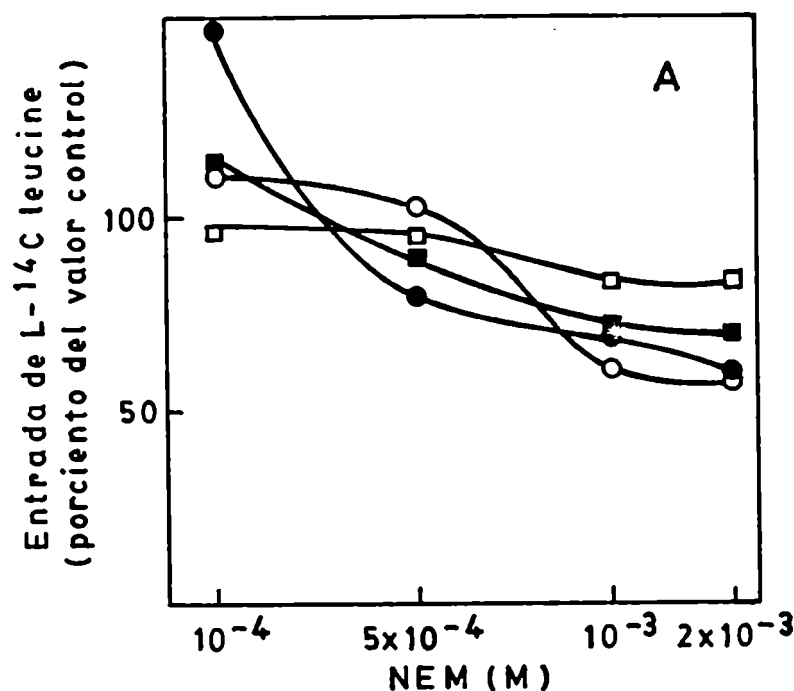


Figura 6.1.A: Efecto de NEM sobre la entrada de L-leucina en protoplastos.

Protoplastos energizados de la cepa JB65 por preincubación con D-glucosa 5 mM. se suspendieron en ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5, sorbitol 0,8 M. y se incubaron con L- 14 C leucina en presencia de concentraciones crecientes de NEM según se indica en las absisas.

La NEM se agregó a $T_0-1\text{min}$ y se tomaron muestras a T_0 y $T_0+3\text{min}$ que se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad intracelular. Los símbolos abiertos corresponden a los ligados con L- 14 C leucina 0,05mM. (○) y 1,0 mM. (□) y los símbolos cerrados a las translocaciones ($T_t = T_0+3\text{min} - T_0$) con L- 14 C leucina 0,05 mM. (●) y 1,0 mM. (■). Los resultados se expresan como porcentaje de entrada del control sin NEM.

cepa mutante JB64 (figura 6.1.B).

Con el objeto de establecer el efecto de un agente reductor de grupos tioles se incubaron protoplastos con DTT 10 mM. durante 15 minutos, previo a la medida de incorporación de leucina. Los resultados obtenidos se presentan en la

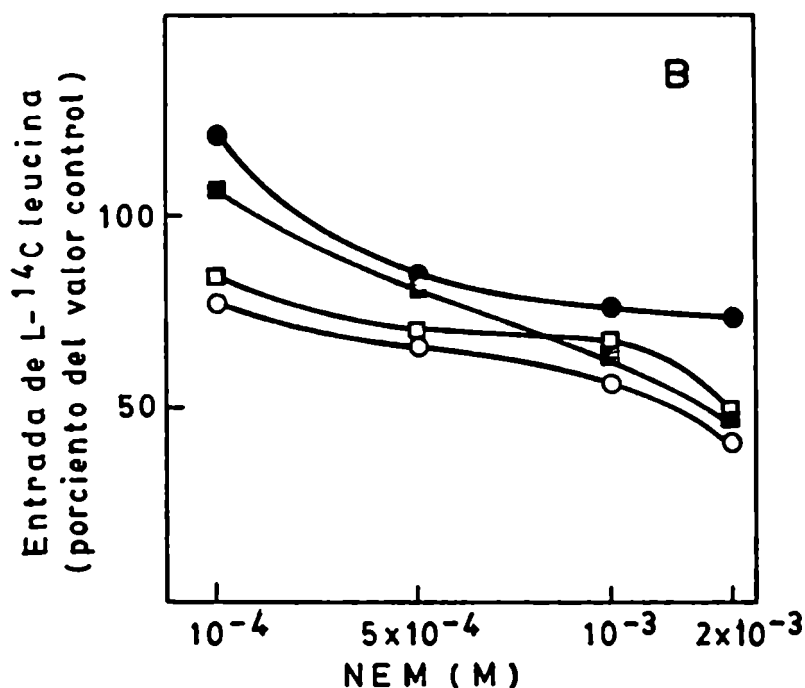


Figura 6.1.B: Efecto de NEM sobre la entrada de L-leucina en protoplastos.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 6.1.A con protoplastos de la cepa mutante JB64.

tabla 6.1.

Estos resultados demuestran que por este tratamiento no se modificaron los valores de entrada del aminoácido, resultados similares se obtuvieron agregando DTT un corto tiempo antes de la L-leucina, llevando a cabo la medida de incorporación en su presencia.

El efecto de NEM sobre la incorporación de L-leucina en protoplastos preincubados con DTT se presentan en la tabla 6.11. En ella se observa que los efectos son similares a los descritos anteriormente con protoplastos no tratados tanto en la cepa silvestre como en la mutante, es decir, en estas condiciones experimentales no se observa un efecto del DTT sobre grupos tioles participantes en el mecanismo de entrada.

Tabla 6.1.: EFECTO DEL DTT SOBRE LA ENTRADA DE L-LEUCINA EN PROTOPLASTOS. CEPAS JB65 Y JB64.

Cepa	S_1		S_2	
	T_0	T_t	T_0	T_t
JB65	106	96	107	91
JB64	104	91	109	97

Protoplastos energizados con D-glucosa 5 mM. se incubaron con DTT 10 mM. en sorbitol 0,8 M durante 15 minutos. Posteriormente se extrajo el DTT del medio por centrifugación y los protoplastos se resuspendieron en ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5, sorbitol 0,8 M. e incubaron con L- ^{14}C leucina 0,05 mM. (S_1) y 1,0 mM. (S_2). A T_0 y T_0+3min se tomaron muestras que se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad intracelular para el cálculo de los valores de ligado y translocación (T_0 y $T_t = T_0+3min - T_0$).

Los resultados se expresan en porcentaje de entrada respecto del control sin preincubar.

Tabla 6.11.: EFECTO DE NEM SOBRE LA INCORPORACION DE L-LEUCINA EN PROTOPLASTOS PRETRATADOS CON DTT. CEPAS JB65 Y JB64.

Cepa	Adición T_{O-1min}	S_1		S_2	
		T_O	T_t	T_O	T_t
JB65	NEM $10^{-4}M$	111	147	93	128
	NEM $10^{-3}M$	50	70	65	73
JB64	NEM $10^{-4}M$	85	125	100	90
	NEM $10^{-3}M$	71	75	66	64

Los protoplastos energizados se pretrataron con DTT según se describe en la tabla 6.1. y se incubaron con $L-^{14}C$ leucina 0,05 mM. (S_1) y 1,0 mM. (S_2) en presencia de NEM que se agregó al medio de incubación a T_{O-1min} . T_O y T_t representan el ligado y la translocación de L-leucina respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje de entrada respecto del control ensayado en ausencia de NEM.

6.1.2. Ensayos en células enteras.

En células enteras se estudió el efecto de la NEM en condiciones análogas a las utilizadas en protoplastos. Los resultados presentados en la tabla 6.III. muestran que con concentraciones de NEM 1 mM. inhiben el ligado y la translocación, similar a lo hallado en protoplastos. Las menores concentraciones de NEM ensayadas (10^{-4} M), produjeron un ligero estímulo de la translocación del sistema S_1 en las dos cepas, efecto que se repitió sistemáticamente en todos los ensayos realizados; sobre el ligado de ese sistema y sobre el sistema S_2 no se produjeron modificaciones significativas.

Según se describió en Materiales y Métodos, en la preparación de protoplastos las células se someten a un pretratamiento con DTT. Ya que este tratamiento podría ser responsable de las diferencias observadas entre células enteras y protoplastos, sobre todo en las estimulaciones, se ensayó el efecto de la NEM sobre células enteras pretratadas con DTT y los resultados se presentan en la tabla 6.IV.

Los resultados obtenidos en estos ensayos fueron similares a los obtenidos con células sin tratar con DTT; estableciéndose una analogía con lo observado en protoplastos, el efecto producido por la NEM no resultó modificado por el pretratamiento con DTT.

6.2. La N-fenilmaleimida (NFM) también es capaz de modificar la entrada de L-leucina.

La NFM es un derivado de la NEM de carácter más hidrofóbico debido a que posee un grupo fenilo como sustituyente en lugar del grupo etilo presente en la NEM.

Tabla 6.111.: EFECTO DE NEM SOBRE LA INCORPORACION DE L-LEUCINA EN CELULAS ENTERAS.

Cepa	Adición T_{O-1min}	S_1		S_2	
		T_0	T_t	T_0	T_t
JB65	NEM $10^{-4}M$	97	114	96	97
	NEM $10^{-3}M$	71	68	65	61
JB64	NEM $10^{-4}M$	94	115	103	100
	NEM $10^{-3}M$	82	68	76	66

Se siguieron las indicaciones descriptas en la figura 6.1. excepto que en lugar de protoplas-
tos se emplearon células enteras. Los resultados se expresan como porciento de entrada res-
pecto del control sin NEM.

Tabla 6.IV.: EFECTO DE NEM SOBRE LA INCORPORACION DE L-LEUCINA EN CELULAS ENTERAS PRETRATADAS CON DTT. CEPAS JB65 Y JB64.

Cepa	Adición	S ₁		S ₂	
		T ₀	T _t	T ₀	T _t
JB65	NEM 10 ⁻⁴ M	95	114	110	89
	NEM 10 ⁻³ M	62	69	71	61
JB64	NEM 10 ⁻⁴ M	80	108	96	99
	NEM 10 ⁻³ M	66	65	76	61

Se siguieron las indicaciones descriptas en la tabla 6.II. excepto que en lugar de protoplasmas se emplearon células enteras. Los resultados se expresan como porcentaje de entrada respecto del control sin NEM.

La mayor hidrofobicidad le confiere a la molécula mayor penetrabilidad en la membrana plasmática y permite detectar la presencia de grupos tioles ubicados en entornos hidrofóbicos de las proteínas.

En condiciones experimentales similares a las empleadas con NEM se estudió el efecto de NFM sobre la entrada de leucina en células enteras y protoplastos.

6.2.1. Ensayos en protoplastos.

Los resultados presentados en la figura 6.2.A y B son los obtenidos en protoplastos de las cepas JB65 y JB64 respectivamente.

En el sistema S_2 de la cepa silvestre, la NFM $10^{-5}M$, produjo una inhibición parcial de los valores de ligado y estimulación de los de translocación sin afectar la entrada de leucina por el sistema S_1 . Concentraciones mayores del reactivo, como $10^{-3}M$, resultaron inhibitorias de los valores de ligado y translocación en los dos sistemas.

En la cepa mutante no se observaron estímulos a concentración externa $10^{-5}M$, sin embargo, esta concentración inhibió parcialmente los valores de translocación del sistema S_2 sin afectar los valores de translocación del sistema S_1 ni los de los ligados de ninguno de los dos sistemas. Concentraciones mayores produjeron inhibiciones de los ligados y las translocaciones de ambos sistemas, siendo casi total (90%) la inhibición de las translocaciones a concentración $10^{-3}M$ de NFM.

6.2.2. Ensayos en células enteras.

Los resultados obtenidos en células enteras se presentan en la figura 6.3.A y B para las cepas silvestre y mutante

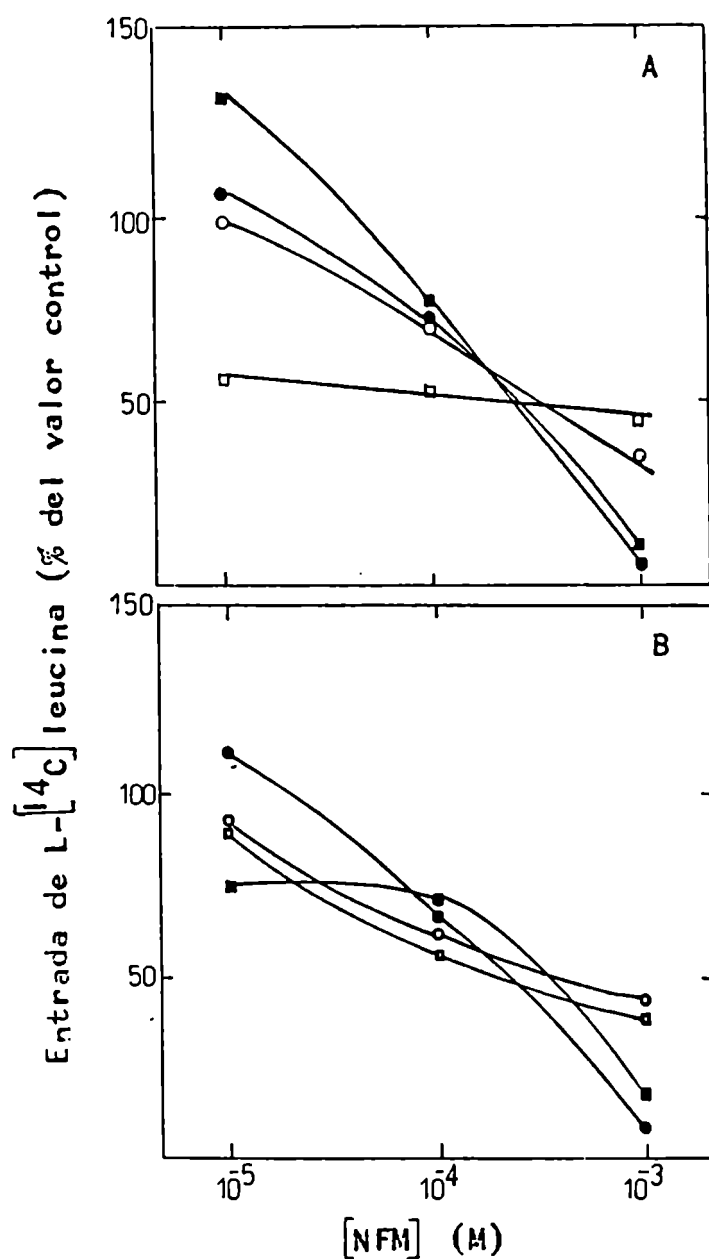


Figura 6.2.: Efecto de NFM sobre la entrada de L-leucina en protoplastos.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 6.1.A y B excepto que se empleó NFM.

(A) Copa silvestre JB65; (B) cepa mutante JB64.
S₁T₀ (○); S₁T_t (●); S₂T₀ (□); S₂T_t (■).

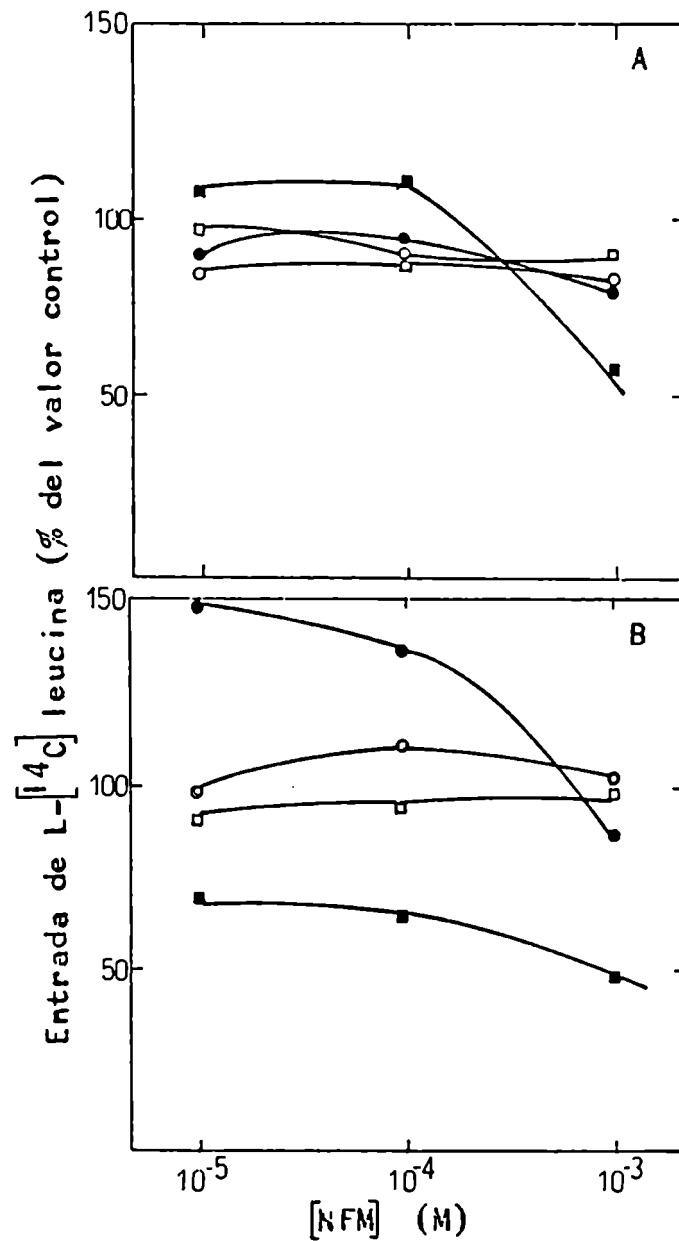


Figura 6.3.: Efecto de NFM sobre la entrada de L-leucina en células enteras.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 6.1.A y B excepto que se emplearon células enteras que fueron tratadas con NFM.

(A) Copa silvestre JB05, (B) copa mutante JB04. S₁T₀ (○); S₁T_t (●); S₂T₀ (□); S₂T_t (■).

respectivamente. Estos difieren significativamente de los obtenidos en protoplastos.

Resulta notable la falta de sensibilidad de los ligados de ambos sistemas a la NFM aún a concentración $10^{-3}M$, condición que resultó capaz de producir 50% de inhibición del ligado en protoplastos.

Además, el grado de inhibición observado en las translocaciones aún con la máxima concentración ensayada, resultó significativamente inferior al alcanzado en protoplastos. A pesar de ello, la mayor sensibilidad observada en protoplastos para la translocación del sistema S_2 en la cepa JB64 se detectó en los ensayos en células enteras.

Estos resultados sugieren que la transformación de células en protoplastos produce modificaciones que se traducen en un aumento de la reactividad de los grupos sensibles a la presencia de este reactivo.

Si se tiene en cuenta que en la preparación de los protoplastos es removida la pared celular y como consecuencia, es liberado al medio el contenido del espacio periplasmático, es posible considerar que éstos podrían constituir así la primer barrera a atravesar por cualquier sustrato antes de ser incorporado al interior de la célula.

Es también importante tener en cuenta que en los protoplastos la membrana plasmática se halla expuesta en forma descubierta al medio externo por lo que un reactivo lipofílico, como la NFM, interactuará fácilmente con ésta, como consecuencia de su partición entre dos medios inmiscibles.

6.3. Los grupos sensibles a las maleimidas no se hallan orientados hacia la superficie externa de la célula.

La glutatión maleimida I (GSMAL I), como ya se describió,

es un derivado de la maleimida que posee unido al ciclo, una molécula de glutatión que reemplaza al resto etilo presente en la NEM, esta sustitución la convierte en un compuesto incapaz de atravesar la membrana citoplasmática y por lo tanto resulta muy útil para la detección de grupos tioles orientados hacia el exterior de la célula.

Los resultados obtenidos con protoplastos al estudiar el efecto de la GSMAL I sobre el transporte de L-leucina se presenta en la tabla 6.V. No se observaron efectos de GSMAL I en los ligados ni en las translocaciones de L-leucina.

Aún concentraciones 10^{-3} M. del reactivo fueron inefectivas en modificar el transporte del aminoácido a tiempos de incubación de hasta 20 minutos. Esta ausencia de efecto por un reactivo impermeable indica que los grupos sensibles a las distintas maleimidias, responsables de los efectos descritos previamente, no son accesibles o no se hallan orientados hacia la superficie externa de la membrana citoplasmática.

6.4. El ácido fluoresceín mercuriacético (FMA) afecta principalmente el ligado de L-leucina por el sistema S₂.

Con el propósito de indagar la localización de grupos tioles en entornos hidrofílicos se estudió el efecto de FMA sobre la entrada de L-leucina, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.VI.

Se observa en esta tabla que en ambas cepas los resultados obtenidos fueron similares, los valores de ligado del sistema S₁ no se modificaron por este reactivo pero se produjo una inhibición parcial de los mismos en el sistema S₂, en este último caso la inhibición fue de un 20% con las concentraciones más altas empleadas.

Tabla 6.V.: EFECTO DE LA GSMAL I SOBRE LA ENTRADA DE L-LEUCINA EN PROTOPLASTOS. CEPAS JB65 Y JB64.

Cepa	Adición GSMAL I	S ₁		S ₂	
		T ₀	T _t	T ₀	T _t
JB65	10 ⁻⁴ M				
	T _{0-5min}	90	104	87	103
	10 ⁻³ M				
	T _{0-5min}	94	104	96	105
	10 ⁻³ M				
	T _{0-20 min}	93	93	96	102
JB64	10 ⁻³ M				
	T _{0-5min}	89	109	92	95
	10 ⁻³ M				
	T _{0-20min}	100	103	103	91

Protoplastos energizados por preincubación con D-glucosa 5 mM. se suspendieron en ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5, sorbitol 0,8 M. y se incubaron con L-¹⁴C leucina 0,05 mM. (S₁) y 1 mM. (S₂) en presencia de GSMAL I en las concentraciones indicadas. La GSMAL I se agregó a T_{0-5min} ó T_{0-20min} según corresponda y a T₀ y T_{0+3min} se tomaron muestras que se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad intracelular a partir de las cuales se calcularon los valores de ligado y translocación (T₀ y T_t = T_{0+3min} - T₀)

Tabla 6.VI.: EFECTO DE FMA SOBRE LA ENTRADA DE L-LEUCINA EN PROTOPLASTOS. CEPAS JB65 Y JB64.

Cepa	Adición	S ₁		S ₂	
		T ₀	T _t	T ₀	T _t
JB65	10 ⁻⁶ M	110	99	87	93
	10 ⁻⁵ M	103	104	82	89
	10 ⁻⁴ M	96	92	80	72
JB64	10 ⁻⁶ M	100	91	88	93
	10 ⁻⁵ M	95	87	80	93
	10 ⁻⁴ M	103	85	80	83

Se siguieron las indicaciones descriptas en la tabla 6.V. excepto que se empleó FMA que se adicionó a T₀-5min en las concentraciones indicadas.

JB65.

Protoplastos de la cepa JB65 energizados por preincubación con D-glucosa 5 mM. se suspendieron en ftalato de potasio 20 mM. pH 4,5, sorbi

Con el FMA en el rango de las concentraciones estudiadas $10^{-4}M - 10^{-6}M$ no se observaron efectos inhibitorios sobre el consumo de oxígeno.

Estos resultados permiten considerar que ciertos efectos inhibitorios, como los de NEM o NFM $10^{-3}M$, podrían estar asociados a la acción de los reactivos sobre los mecanismos generadores de energía como lo ejemplifica la determinación del consumo de oxígeno. En contraste, la ausencia de efectos detectables sobre la respiración celular, como con NEM, NFM y FMA $10^{-4}M$, permitirían sugerir que los efectos observados sobre la entrada de leucina podrían relacionarse con una acción directa de estos reactivos sobre las entidades responsables del transporte.

7. Participación del potencial de membrana.

7.1. ¿Qué relación existe entre el gradiente electroquímico y el transporte de nutrientes en levaduras?

Ha sido firmemente establecida la participación de gradientes electroquímicos en procesos de incorporación de nutrientes en diversas células. En el caso de las bacterias la generación de este tipo de gradientes permite la acumulación de diversos nutrientes, y como ya se ha comentado, se hallan íntimamente involucrados en la generación de ATP. Más aún, los resultados de estudios de transporte en vesículas de membrana citoplasmática de bacterias, han aportado resultados que corroboran y reafirman la hipótesis quimiosmótica de Mitchell.

En el caso de otros microorganismos hay menor información de la relación existente entre el transporte de nutrientes y el gradiente electroquímico a través de la membrana citoplasmática. Tres líneas de trabajo contribuyen a considerar que el sistema de transporte activo-potencial de membrana opera en Saccharomyces cerevisiae: a) algunos azúcares como maltosa (Seaston y col. 1973, Serrano, 1977) y aminocidos como glicina y prolina (Seaston y col. 1973) se cotransportan con protones, b) ciertos cationes lipofílicos se acumulan en levaduras (Vacata y col. 1981, Boxman y col. 1982) lo que sugiere la existencia de un potencial electroquímico de membrana, y c) se ha demostrado la existencia de una ATPasa de membrana citoplasmática capaz de generar un gradiente electroquímico.

Asimismo la relación existente en levaduras entre el transporte activo y el gradiente electroquímico de membrana, que incluye un gradiente eléctrico ($\Delta\Psi$) y un gradiente de concentración de protones (ΔpH), y la participación de la

protón ATPasa no ha sido definitivamente establecido.

Con el fin de indagar este problema como parte de nuestro estudio del transporte de leucina en S. cerevisiae, se decidió realizar la determinación del gradiente de protones existente en las condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de incorporación. Esto ha permitido relacionar el gradiente de potencial con el estado energético celular y las medidas de incorporación de leucina.

7.2. La difusión de un ácido débil al interior de la célula permite estimar el gradiente de pH.

La medida de distribución de un ácido débil no metabolizable, entre los compartimentos intra y extracelulares, puede utilizarse para cuantificar el gradiente de protones a través de la membrana citoplasmática (Rottemberg, 1979).

Para poder calcular la concentración intracelular se determinó el contenido de agua intracelular según se describió en Materiales y Métodos. El valor obtenido en estas determinaciones fue 2 ml/g. de peso seco.

Se realizaron posteriormente experiencias utilizando ácido propiónico marcado isotópicamente, según describieran De la Peña y col. (1982) para la determinación de un gradiente de pH en levaduras de la cepa JB65. Los resultados obtenidos presentados en la tabla 7.1. muestran que la recuperación del ácido propiónico resulta ineficiente. Un alto porcentaje del nucleído se pierde, sobre todo al utilizar el ácido propiónico marcado en el carbono uno. Este hecho sugiere la metabolización del ácido presuntamente por un proceso de descarboxilación (Ramos y col. 1969), liberándose parte de la radiactividad como dióxido de carbono.

Al utilizar ácido benzoico en condiciones análogas se

Tabla 7.1.: DISTRIBUCION INTRA-EXTRACELULAR DE ACIDOS DEBILES EN CELULAS DE S.CEREVISIAE
CEPA JB65.

Tiempo (min)	Acido	Intracelular DPM %	Extracelular DPM %	No recuperado DPM %
5	¹⁴ C propiónico 0,4 mM	9	43	48
15		10	32	58
5	¹⁴ C propiónico 0,4 mM	15	64	21
15		22	50	28
5	¹⁴ Carboxi Benzoico 0,05 mM	34	59	7
15		33	63	4

Células energizadas por preincubación con D-glucosa se suspendieron en ftalato de potasio 20 ml, pH 4,5 y se incubaron con los ácidos indicados. A T₀+5min se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intra y extracelular. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad agregada.

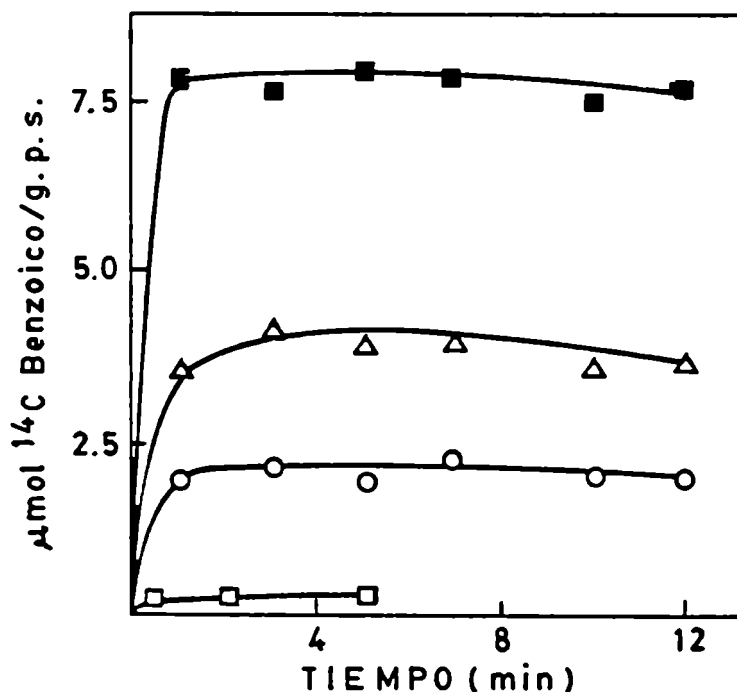


Figura 7.1.: Incorporación de ácido benzoico en células energizadas de la cepa JB65.

Células energizadas por preincubación con D-glucosa se suspendieron en itatato de potasio 20 mM pH 4,5 y se incubaron en presencia de ácido ^{14}C benzoico (□) 0,01 mM, (○) 0,05 mM, (△) 0,1 mM y (■) 0,2 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

verificó una recuperación satisfactoria, Tabla 7.1., por lo que se consideró apropiado su empleo para llevar a cabo las determinaciones de ΔpH .

La figura 7.1. presenta los resultados de experimentos realizados para determinar el tiempo necesario para alcanzar

un estado de equilibrio de distribución con distintas concentraciones externas de ácido benzoico en células energizadas de la cepa JB65. En el rango de concentraciones de 0,01 mM. a 0,2 mM. se observó una rápida incorporación, y en todos los casos a partir del minuto de ensayo se alcanzó un estado estacionario.

De la relación de concentraciones intra-extracelular, de las especies radiactivas (C_i/C_e), se calculó el valor de pH intracelular de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[H^+]_i = \left[\frac{C_i}{C_e} \left(\frac{1}{H^+_e} + \frac{1}{K_d} \right) - \frac{1}{K_d} \right]^{-1}$$

Los resultados obtenidos con distintas concentraciones externas de ácido benzoico resultaron similares y se presentan en la tabla 7.11., a partir de éstos se empleó ácido benzoico 0,05 mM. para realizar las determinaciones que se describen a continuación.

7.3. La energización de las células con glucosa se tradujo en un aumento del pH intracelular.

Cuando la medida de distribución del ácido benzoico se realizó en levaduras silvestres con distinta carga energética se obtuvieron los trazados presentados en la figura 7.2.

Las levaduras con baja carga energética por ayuno, con alta carga energética por preincubación con D-glucosa, o ayunadas que consumen D-glucosa en forma simultánea, incorporan el ácido hasta alcanzar un equilibrio. En todas las condiciones ensayadas este equilibrio se alcanza rápidamente, en células con alta o baja carga energética, estado energético preestablecido, los valores de ácido benzoico incorporado son prácticamente constantes a partir de un minuto

Tabla 7.11.: DISTRIBUCION INTRA-EXTRACELULAR, pH INTRACELULAR Y ΔpH A DISTINTAS CONCENTRACIONES EXTERNAS DE ACIDO BENZOICO

Concentración externa (μM)	C_i/C_e	pH_i	$\Delta \text{pH} = \text{pH}_i - 4,50$
10	45	6,32	1,82
50	46	6,34	1,84
100	48	6,36	1,86
200	48	6,36	1,86

Se siguieron las indicaciones descriptas en la figura 7.1. Los valores de pH_i se calcularon según se describe en el texto.

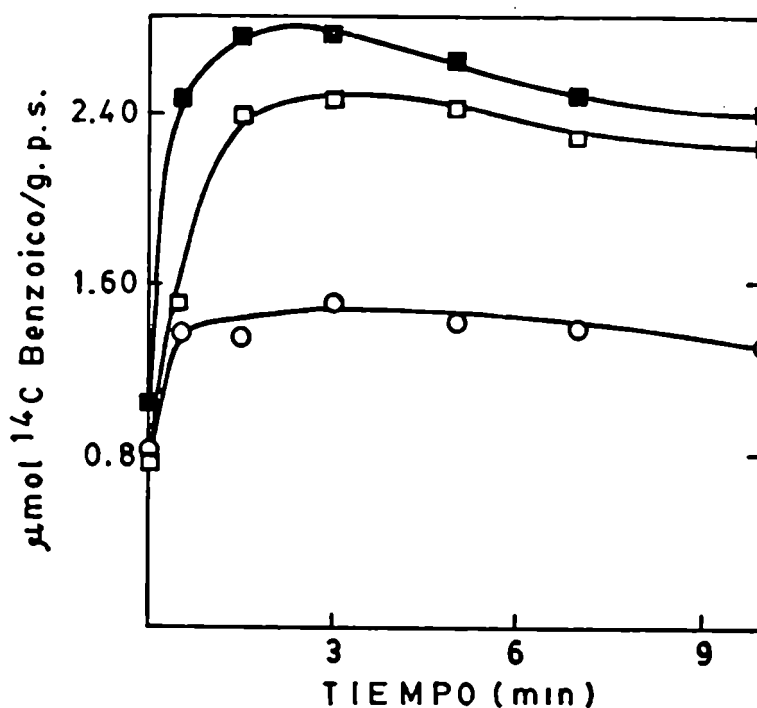


Figura 7.2.: Efecto de la energización con D-glucosa sobre la incorporación de ácido benzoico en células de la cepa JB65.

Células de la cepa JB65 en distintas condiciones metabólicas se suspendieron en itatato de potasio 20 mM, pH 4,5 en presencia de ácido ^{14}C benzoico 0,05 mM. (○) Células ayunadas (■) células energizadas por preincubación con D-glucosa 5 mM. y (□) células ayunadas incubadas con ácido benzoico en presencia de D-glucosa 5 mM. agregada a T_0 . A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

Con el consumo simultáneo de D-glucosa se pudo visualizar el pasaje de un estado de baja carga energética a uno de alta carga energética con una mayor incorporación de benzoico, haciéndose ésta constante a partir de los 3 minutos.

Estos equilibrios resultaron dinámicos ya que se verificó que por el agregado de D-glucosa a células ayunadas en las cuales se estableció previamente el equilibrio de distribución de ácido benzoico, se produjo una modificación del

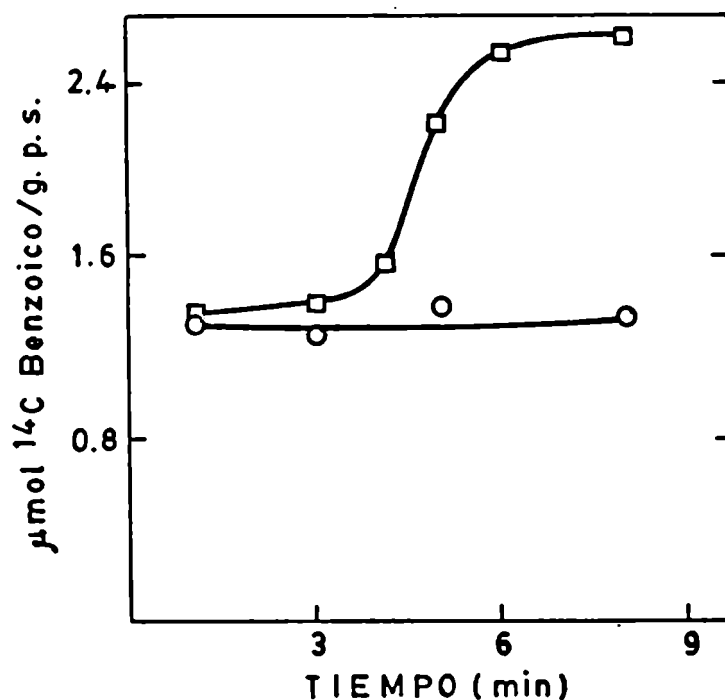


Figura 7.3.: Efecto de la D-glucosa sobre el equilibrio de distribución de ácido benzoico.

Células ayunadas de la cepa JB65 se suspendieron en ftalato de potasio 20 mM, pH 4,5 y se incubaron en presencia de ácido ^{14}C benzoico 0,05 mM. A $T_0+3\text{min}$ se agregó D- glucosa 5 mM. (□) ó igual volumen de agua (○) al medio de reacción. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

estado de equilibrio alcanzándose una nueva condición de equilibrio al cabo de 3 minutos, determinando el valor de pH intracelular análogo al determinado en células preincubadas, figura 7.3.

Así los valores de incorporación y los de pH y Δ pH calculados a partir de éstos, fueron los que se presentan en la tabla 7.III.

Tabla 7.III.: EFECTO DE LA D-GLUCOSA SOBRE LA INCORPORACION DE ACIDO BENZOICO, EL PII INTRA-
CELULAR Y EL Δ PII EN CELULAS DE LA CEPA JBG5.

Condición metabólica	Acido benzoico incorporado (μ mol/g.)	pH;	Δ pii	Δ piix 59 (mV)
Ayunadas	1,36	5,90	1,40	83
Preincubadas con D-glucosa 5 mM	2,50	6,23	1,73	102
Ayunadas más D-glucosa 5 mM a T ₀	2,30	6,22	1,72	101

Se siguieron las indicaciones descriptas en la figura 7.3.

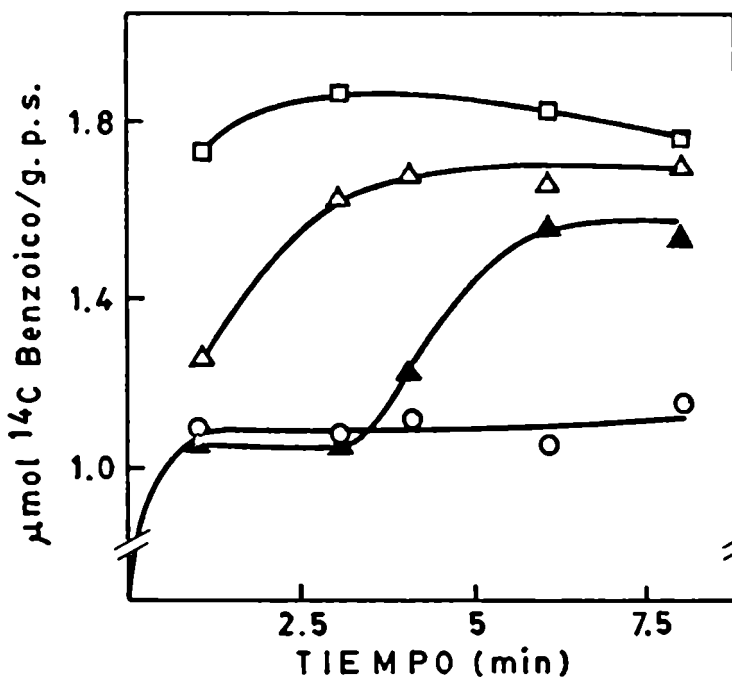


Figura 7.4.: Efecto del etanol sobre la distribución de ácido benzoico.

Células de la cepa JB65 en distintas condiciones metabólicas se suspendieron en itatato de potasio 20 ml, pH 4,5 y se incubaron en presencia de ácido ^{14}C benzoico 0,05 mM. (○) Células ayunadas, (□) células energizadas por preincubación con etanol 10 ml. durante 15 minutos, (Δ,▲) Células ayunadas incubadas con ácido benzoico en presencia de etanol 10 ml. agregado a T_0 ó $T_0+3\text{min}$. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

7.4. En células silvestres el etanol es capaz de generar un aumento del pH intracelular.

Como se estableció previamente, el consumo de etanol estimula la incorporación de leucina. La medida de incorporación de ácido benzoico en células que consumen etanol permitió la obtención de los resultados que se presentan en la figura 7.4.

Las determinaciones se realizaron con levaduras ayunadas,

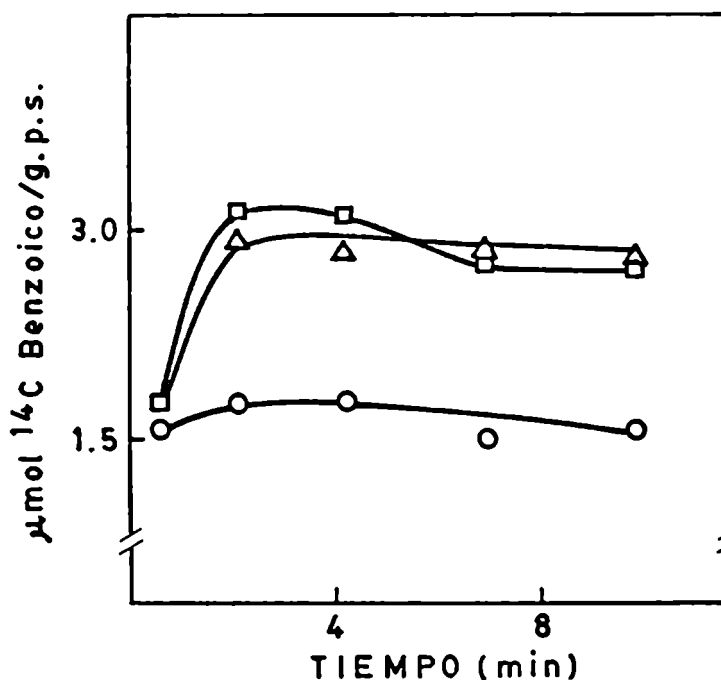


Figura 7.5.: Efecto de las distintas fuentes energéticas empleadas sobre la incorporación de ácido benzoico en células de la cepa JB65.

Células ayunadas de la cepa JB65 se suspendieron en itatato de potasio 20 mM, pH 4,5 y se incubaron con ácido ^{14}C benzoico 0,05 mM. en presencia de (□) D-glucosa 5 mM. ó (Δ) etanol 10 mM. agregados a T_0 . (○) control sin adiciones. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

levaduras preincubadas con etanol y levaduras a las cuales éste se agregó al medio de reacción a T_0 ó a $T_0+3\text{min}$.

En levaduras ayunadas la incorporación de ácido benzoico fue la discutida previamente, la preincubación con etanol permite una mayor incorporación de ácido benzoico y se verifica que su distribución alcanza un estado estacionario en tiempos cortos, aproximadamente en 1 minuto. Este dato es semejante al obtenido con D-glucosa.

Cuando las células ayunadas comienzan a consumir etanol

Tabla 7.IV.: EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA DISTRIBUCION DE ACIDO BENZOICO, EL PH INTRACELULAR Y EL Δ PH EN CELULAS DE LA CEPA JR65.

Condición metabólica	Etanol 10 ml	C_i / C_e	pH _i	Δ pH	Δ pH _X 59 (mV)
Ayunadas	---	17	5,91	1,41	83
Ayunadas	a T ₀	28	6,12	1,62	96
Ayunadas	a T ₀ +3min	27	6,10	1,60	94
Preincubada etanol 10 ml	---	32	6,13	1,68	99

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 7.4.

se observa, como en el caso de la D-glucosa, que se produce un aumento de la incorporación del ácido, evidenciando una alcalinización del medio intracelular, el equilibrio se alcanza al cabo de 3 minutos. Un dato similar se observa en el trazado correspondiente al agregado de etanol a células en las cuales se estableció previamente el equilibrio de distribución del benzoico (T_{0+3min}).

Los valores calculados de pH intracelular y Δ pH se resumen en la tabla 7.IV.

La figura 7.5. presenta los resultados obtenidos al ensayar la adición de D-glucosa o etanol en forma alternativa en células ayunadas de la cepa JB65. Estos resultados confirman los presentados en las figuras 7.2. y 7.4., ambos sustratos fueron igualmente efectivos en generar un incremento del gradiente de pH.

7.5. La cepa mutante JB64 se distingue de la silvestre JB65 al estudiar el consumo de etanol.

En la cepa mutante se midió la distribución de ácido benzoico en células ayunadas, con alta carga energética por preincubación con D-glucosa o etanol y en células en que se genera un aumento del gradiente por el consumo "in situ" de estos sustratos. En la figura 7.6. se presentan los resultados de dichos experimentos.

Las células ayunadas, preincubadas o que consumen D-glucosa en forma simultánea mostraron una respuesta similar a la observada con la cepa silvestre JB65. Si bien la preincubación con etanol produjo una respuesta comparable a la obtenida con la cepa silvestre, al estudiar el consumo simultáneo de etanol se observaron significativas diferencias

Tabla 7.V.: EFECTO DE LA CONDICION METABOLICA SOBRE LA INCORPORACION DE ACIDO BENZOICO
EL PH INTRACELULAR Y EL ΔPH EN CELULAR DE LA CEPA JB64.

Condición metabólica	Adición a T_0	C_i/C_e	pH _i	ΔpH	$\Delta pH \times 59$ (mV)
Ayunadas	---	15	5,83	1,33	78
Ayunadas	D-glucosa 5 ml	47	6,35	1,85	109
Ayunadas	Etanol 10 ml	41,5	6,29	1,79	106
Preincubadas con D-glucosa 5 ml	---	45	6,33	1,83	108
Preincubadas con etanol 10 ml	---	43	6,31	1,81	107

Se siguieron las indicaciones descriptas en la figura 7.6.

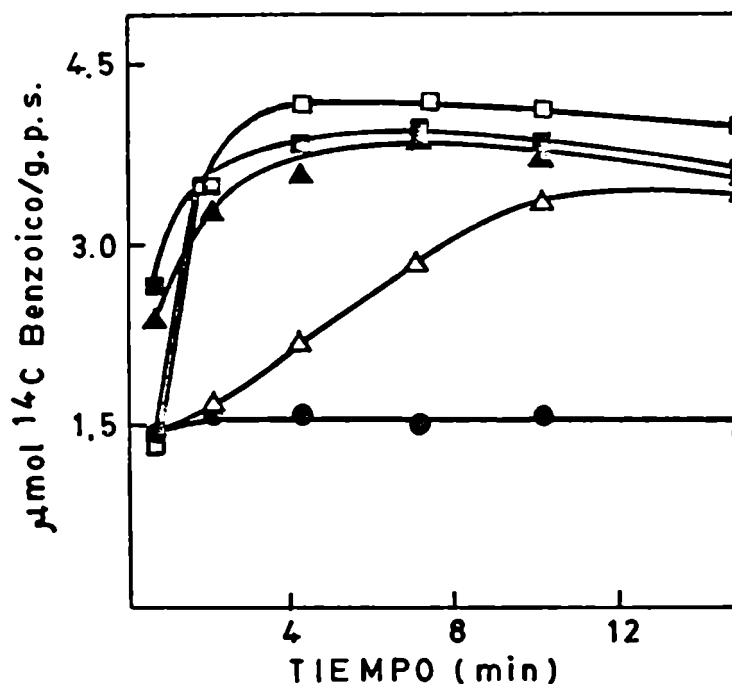


Figura 7.6.: Efecto de la D-glucosa y el etanol sobre la incorporación de ácido benzoico en células de la cepa JB64.

Células de la cepa JB64 en distintas condiciones metabólicas se suspendieron en itato de potasio 20 mM, pH 4,5 y se incubaron con ácido ^{14}C benzoico 0,05 mM. (●) Células ayunadas, (■) células energizadas por preincubación con D-glucosa 5 mM, (▲) células energizadas por preincubación con etanol 10 mM, (□) células ayunadas incubadas con ácido benzoico en presencia de D-glucosa 5 mM. agregado a T_0 y (Δ) células ayunadas incubadas con ácido benzoico en presencia de etanol 10 mM. agregado a T_0 . A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

respecto de la cepa silvestre. En este caso la incorporación de ácido benzoico aumenta en función del tiempo en forma lenta y alcanza un valor constante recién al cabo de 10 minutos de incubación.

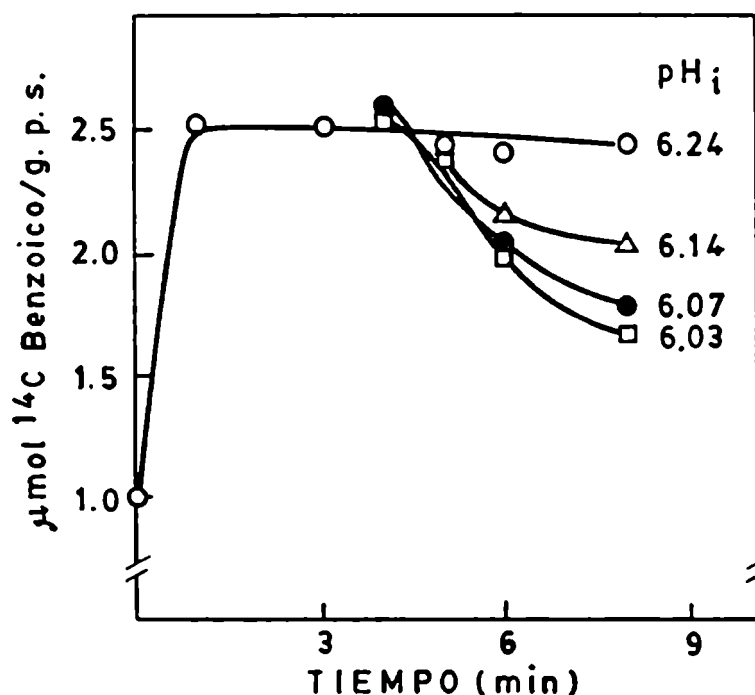


Figura 7.7.: Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la incorporación de ácido benzoico.

Células de la cepa JB65 energizadas por preincubación con D-glucosa 5 mM. se suspendieron en ftalato de potasio 20 mM, pH 4,5 y se incubaron en presencia de ácido ^{14}C benzoico 0,05 mM. A $T_0+3\text{min}$ se agregó al medio de incubación (□) DNP 0,1 M., (●) DNP 0,05 mM, (△) DNP 0,01 mM y (○) control sin adiciones. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

Este hecho pone claramente de manifiesto el defecto mitocondrial que caracteriza a esta mutante. En íntima relación con este fenómeno debemos destacar que resulta escasa o nula a tiempos cortos, la estimulación de la incorporación de leucina producida en esta mutante por el etanol, resultados presentados en la figura 3.2. Los valores de pH_i calculados en estas condiciones se resumen en la tabla 7.V.

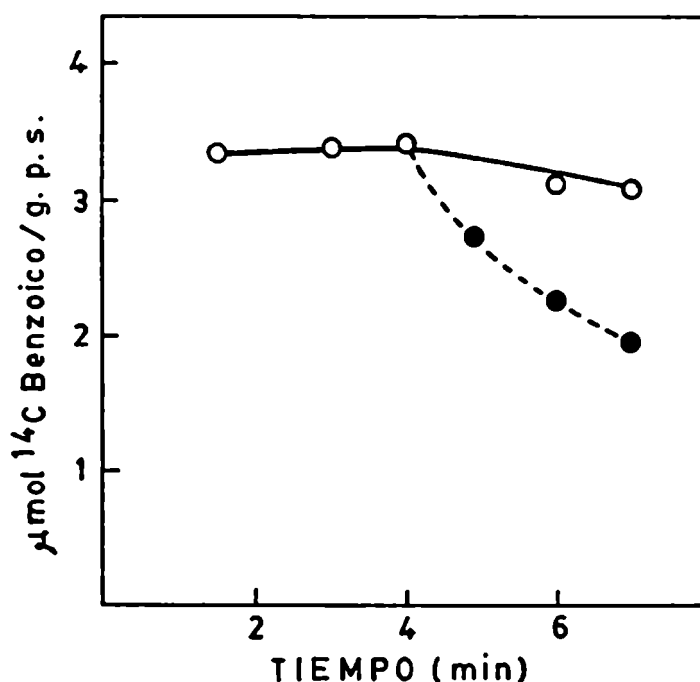


Figura 7.8.: Efecto de N-etilmaleimida sobre la incorporación de ácido benzoico.

Células de la cepa JB65 energizadas por preincubación con D-glucosa 5 mM. se suspendieron en itatato de potasio 20 mM. pH 4,5 y se incubaron en presencia de ácido ¹⁴C benzoico 0,05 mM. A T₀+3min se agregó al medio de incubación (●) NEM 1 mM, (○) control sin adición. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de radiactividad.

7.6. El 2,4-dinitrofenol (DNP) y la N-etilmaleimida (NEM) colapsan el gradiente de protones.

Se ha presentado anteriormente la inhibición parcial de la entrada de leucina producida por el DNP y ciertos reactivos de grupos tioles.

El primero se comporta como conductor de protones y por lo tanto, produce el colapso del gradiente establecido a través de la membrana citoplasmática, los segundos fueron

capaces de inhibir mecanismos celulares de generación de energía metabólica, Figura 6.6.

Para confirmar estos resultados se estudió la distribución de ácido benzoico en células energizadas de la cepa JB65 a las cuales se trató con DNP 0,01 mM. a 0,1 mM. 6 NEM 0,1 mM a 1 mM.

Los resultados obtenidos con DNP se presentan en la figura 7.7. en ella se observa como el agregado del protonóforo produce la salida de ácido benzoico previamente incorporado como consecuencia de una acidificación intracelular indicando descenso del ΔpH .

Un resultado análogo se observó por adición de NEM 1 mM. figura 7.8. colapsando el gradiente preestablecido, esto sugiere que se produciría la inhibición del mecanismo requerido para el mantenimiento del gradiente, que se tradujo a la vez en una inhibición de la entrada de leucina. Concentraciones de NEM 0,1 mM. no produjeron efectos detectables sobre el gradiente de pH en estas condiciones experimentales.

DISCUSSION

Uno de los primeros pasos de la evolución de la vida lo ha constituido la posibilidad de separación de las células, del medio que las rodea. De acuerdo con Haldane (1954), el evento crítico que mejor puede designarse como "el origen de la vida", fue la inclusión de distintos polímeros autorreplicables, en un recinto cerrado por una membrana semipermeable. Si bien la aparición de la primera membrana plasmática resultó un hecho importante en la futura evolución de las células, trajo aparejado consigo varios inconvenientes. La sola separación no resulta suficiente para mantener un metabolismo celular apropiado y deben operar una serie de mecanismos de incorporación de nutrientes, del medio al interior de las células.

En particular, las levaduras son organismos heterótrofos que requieren diversos compuestos para su crecimiento. A partir de éstos, la célula obtiene los esqueletos carbonados necesarios para la síntesis de sus constituyentes y la energía que le permite llevar a cabo las reacciones que caracterizan a los procesos biosintéticos. En el caso de los aminoácidos, éstos participan en la síntesis de proteínas, macromoléculas esenciales, constituyentes de la materia viva (Oxender, 1972) y previamente deben entrar por un proceso de incorporación al interior de la célula. Este proceso, de acuerdo con evidencias experimentales, involucra: a) el reconocimiento específico del aminoácido del medio externo, por un componente de la barrera de permeabilidad; b) la translocación del aminoácido a través de esa barrera; c) el acoplamiento a un sistema capaz de generar la energía requerida; d) la liberación del aminoácido en el interior de la célula.

Se ha sugerido que, en algunos casos, es posible una salida simultánea hacia el exterior y por lo tanto el balance entre la entrada y la salida, determina la magnitud de la acumulación intracelular del sustrato incorporado. En el caso de levaduras, como ya se comentó en 1.4., el proceso de salida de aminoácidos es prácticamente despreciable, siendo la incorporación de aminoácidos un proceso básicamente unidireccional (Van den Broeck y Van Steveninck 1983).

En el presente trabajo se estudió el transporte de L-leucina en levaduras Saccharomyces cerevisiae. Se ha tomado este aminoácido como modelo por su lenta metabolización, por lo que su acumulación constituye un indicador apropiado del proceso de incorporación.

Los experimentos se llevaron a cabo en dos cepas que se diferencian en sus mecanismos productores de energía; una levadura silvestre dotada de un mecanismo mitocondrial competente para proveer compuestos de alta energía y una levadura mutante deficiente en el translocador ATP-ADP mitocondrial (Lauquin y col. 1973).

Según se ha propuesto (Ramos y col. 1975), la incorporación de L-leucina requiere la provisión de energía, por lo tanto los ensayos experimentales se realizaron con células en distintas condiciones metabólicas, con el propósito de investigar la naturaleza de las fuentes energéticas y los mecanismos por los cuales éstas pueden ser acopladas a la incorporación del aminoácido.

Para ello se usaron células ayunadas con baja carga energética, y células energizadas, con alta carga energética por el consumo de sustratos utilizables como fuente de

energía, agregados en forma previa o simultánea a la adición de L-leucina al medio de incubación.

Resultados presentados por distintos autores señalan que durante el ayuno por aereación se produce una rápida caída de los nucleótidos de piridina reducidos y de la velocidad de respiración (Goodwin y col. 1974) y se encontraron significativos efectos sobre la fosforilación oxidativa (Chance, 1959; Ohnishi, 1970; Beck y col. 1968). Asimismo se ha establecido que se consume una parte de la reserva de glucógeno, sin modificar el contenido celular de trehalosa (Panek, 1963).

Para la energización de las células se utilizaron D-glucosa y etanol, ya que las levaduras pueden utilizar azúcares y una gran variedad de compuestos orgánicos como fuentes de energía.

La D-glucosa ha sido y es extensamente empleada como fuente de energía y carbono en cultivos de estos microorganismos. Esta es metabolizada siguiendo el camino glucolítico y en condiciones aeróbicas, a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Asimismo las levaduras pueden crecer en etanol, sustrato metabolizado vía acetaldehído y acetil CoA y a partir de éste, por la operación del ciclo de Krebs, en un proceso inducible por oxígeno y reprimido por glucosa (Roche y Azoulay, 1969; Fowler y col. 1972). Se han descrito variaciones de los niveles de nucleótidos reducidos y del consumo de oxígeno, como consecuencia de su oxidación en levaduras ayunadas (Maitra y Extabrook, 1977). Los equivalentes de reducción, producidos durante la metabolización, son capaces de activar la fosforilación oxidativa, además la

adición de etanol, a células ayunadas, es capaz de estimular la movilización de glucógeno y trehalosa (Maitra y Estabrook, 1967a, Panek, 1962, 1963).

En la primera parte de esta tesis, se estudiaron las propiedades generales de la incorporación de L-leucina en células enteras de levadura y su relación con el estado metabólico y la disponibilidad de fuentes energéticas.

Los resultados obtenidos indican, sobre todo en células energizadas, que la incorporación de L-leucina presenta las características de un proceso concentrativo.

Al estudiar el efecto de la D-glucosa sobre la incorporación de L-leucina, se observó que este sustrato incrementa la velocidad de entrada y acumulación del aminoácido en las dos cepas utilizadas. Esta observación concuerda con la proposición de que la energía resultante del catabolismo de la D-glucosa, es utilizada en el proceso de transporte del aminoácido. En las condiciones experimentales empleadas se observa, al cabo de treinta minutos de incubación con L-leucina, la tendencia a un estado estacionario en la acumulación que permite suponer el funcionamiento de mecanismos de regulación, como la inhibición de la entrada de aminoácidos exógenos por el contenido intracelular, sin olvidar que la disponibilidad del glúcido, rápidamente fermentable, conduce a una modificación funcional interpretada como represión catabólica. No obstante, en las presentes condiciones experimentales, D-glucosa 5 mM, esta alternativa es poco probable, aunque en concentración 100 mM podría justificar los resultados inhibitorios descritos sobre la incorporación de L-leucina (Mazón y col. 1982).

En la cepa mutante la capacidad concentrativa, provocada por el consumo de D-glucosa, queda establecida al

alcanzarse relaciones de concentración intracelular/extracelular de L-leucina semejantes a las encontradas en la cepa silvestre. La metabolización de la D-glucosa, en esta cepa, es suficiente para la provisión de los requerimientos energéticos de la incorporación del aminoácido, a pesar de carecer de un mecanismo eficiente para la translocación de moléculas de ATP de la mitocondria al citoplasma. Esta observación está de acuerdo con las observaciones de Lagunas y Gancedo (1973), quienes sostienen que aún en aerobiosis, el setenta por ciento de la energía es obtenida por la glucólisis.

Al emplear etanol como fuente de energía se comprobó que, en la cepa silvestre, la velocidad de acumulación de L-leucina se incrementa significativamente. En cambio, en la cepa mutante la adición de etanol resulta muy poco efectiva para promover la incorporación del aminoácido. Estos resultados pueden interpretarse considerando que como consecuencia de la mutación, la translocación al citoplasma de compuestos de alta energía (ATP), producidos en la fosforilación oxidativa por metabolización del etanol, resulta insuficiente para la activación del proceso de incorporación de L-leucina. En la cepa silvestre, el consumo de etanol proveería el ATP necesario para que la ATPasa de membrana citoplasmática genere un gradiente de protones, a expensas del cual se llevaría a cabo la acumulación del aminoácido, proceso que se discutirá con mayor detalle más adelante.

El análisis de los experimentos llevados a cabo con células preincubadas con D-glucosa muestra, en comparación con células ayunadas, un sustancial incremento de la velocidad de incorporación de L-leucina y pone además en evi-

dencia un proceso previo a la translocación del aminoácido, en parte dependiente de la carga energética celular y en el cual una fijación inespecífica fue descartada. Este proceso, relacionado con la etapa de reconocimiento de la molécula transportada por un componente de la barrera de permeabilidad se denominó ligado.

La preincubación de las células con etanol, también produce un estímulo sobre la velocidad de incorporación, aunque de menor valor que la D-glucosa. Este estímulo también se observó en la cepa mutante y sugiere que, durante el período de incubación, se genera alguna forma de energía metabólica, como podría ser un incremento del potencial electroquímico de membrana, que es capaz de establecerse a pesar de la deficiencia descrita en esta cepa. El efecto de la preincubación con etanol permite establecer dos características que lo distinguen del producido por la preincubación con la D-glucosa y son: a) el estímulo producido es de menor magnitud y b) no afecta los valores de ligado.

La estimulación de la incorporación de L-leucina, por la presencia de fuentes energéticas en el medio de incorporación, se verificó también con células preincubadas. Este hecho pone de manifiesto una capacidad de las células para incorporar aminoácidos, aún mayor que la alcanzada durante la preincubación. Para que esta estimulación se lleve a cabo requiere la posibilidad de metabolización del sustrato agregado, ya que no se observa por adición de eta nol a células de la cepa mutante preincubadas con ese sustrato.

La imposibilidad de llevar a cabo una posterior metabolización del etanol impediría establecer esa estimulación,

que se puede evidenciar en idénticas condiciones con la cepa silvestre o por agregado de D-glucosa a células de la cepa mutante preincubadas con etanol, ya que la vía glucolítica no se halla afectada por la mutación.

Estos hechos plantean la existencia de dos mecanismos a) utilización de la energía producida por la metabolización de distintos sustratos, en la estimulación del proceso de transporte y b) establecimiento de una fuerza impulsora de la incorporación del aminoácido, presuntamente una fuerza protónmotriz, durante la preincubación.

El empleo de un protonóforo como el DNP permite investigar estos mecanismos. El agregado simultáneo del DNP con las fuentes energéticas inhibe drásticamente la estimulación de la entrada de L-leucina, éste impide la metabolización mitocondrial de dichas fuentes y produciría además un colapso del gradiente de protones de la membrana citoplasmática. Paralelamente, el agregado de DNP a células preincubadas, produce una inhibición parcial de la velocidad de entrada, supuestamente como consecuencia de un colapso del gradiente de protones de la membrana citoplasmática; esta inhibición es casi total en células preincubadas con etanol, donde la velocidad de incorporación del aminoácido cae a valores similares a los hallados en células ayunadas.

Los resultados descriptos, conjuntamente con la distinta respuesta de la entrada y del ligado de L-leucina establecida en células preincubadas con D-glucosa o etanol, sugieren la existencia de una diferencia funcional entre los dos sustratos más allá de su posible metabolización aeróbica o anaeróbica.

Estas consideraciones se hallan reforzadas por la desg

cripción de importantes efectos de la D-glucosa sobre la regulación del metabolismo de la levadura, como el incremento de los niveles de AMPc (Mazón y col. 1982) o la activación de la ATPasa de membrana citoplasmática (Serrano 1983).

Los experimentos realizados posteriormente tuvieron por objeto determinar los parámetros cinéticos de la entrada de L-leucina, en distintas condiciones metabólicas.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de un proceso saturable y son consistentes con la idea de que la translocación del aminoácido involucra dos sistemas, caracterizables por sus parámetros cinéticos, y definidos como sistema S_1 , sistema de alta afinidad y baja velocidad máxima y sistema S_2 , sistema de baja afinidad y alta velocidad máxima. El sistema S_1 hace posible la translocación de la L-leucina cuando su concentración en el medio es relativamente baja, como sucede en los medios naturales y podría ser el transportador fisiológico del aminoácido.

Se observó que, independientemente del estado metabólico celular, los valores de las constantes de afinidad (K_T) no se modificaron en forma significativa, en ninguno de los sistemas. Esta es una evidencia que permite descartar la posible síntesis de sistemas transportadores distintos a los preexistentes como consecuencia de la energización. Asimismo, las velocidades máximas determinadas fueron mayores en las células energizadas, tanto en la cepa silvestre JB65 como en la mutante JB64, lo que puede interpretarse por la aparición de un mayor número de entidades translocadoras activas como consecuencia de su síntesis o por su activación mediada por posibles modificaciones conformacio-

nales o fosforilaciones, quizás relacionadas con el potencial de membrana.

Como ya se describió, los valores de entrada de L-leucina extrapolados a tiempo cero (T_0) dan intercepciones positivas, que se incrementan por la energización de las células con D-glucosa y con la concentración del aminoácido. Los resultados obtenidos al determinar los parámetros que caracterizan la unión del aminoácido, a la barrera de permeabilidad, mostraron la existencia de dos poblaciones de sitios de ligado, operando en el rango de concentraciones descritos para los sistemas de translocación y se definieron por extensión sistemas de ligado S_1 y S_2 respectivamente. En esta fase inicial la respuesta a la energización resultó diferente a la observada en la translocación, en el sistema S_1 se verificó un aumento de sitios de ligado (N_1) con muy poca variación de la constante de afinidad (K_{d1}). El aumento del número de sitios no se detectó en células preincubadas con etanol, reafirmando la observación anterior, respecto de la distinta participación de los sustratos empleados en la energización. Paralelamente en el sistema S_2 se observó una disminución de la constante de afinidad (K_{d2}) que resultó más marcada en la cepa silvestre.

Si bien los datos no justifican totalmente la existencia de por lo menos dos componentes independientes, como constituyentes de cada sistema transportador, la hipótesis más simple, que se ajusta a los datos experimentales es la que propone la existencia de dos etapas en el proceso de entrada, una inicial involucrada en el reconocimiento, ligado o unión del sustrato al sistema de transporte y una etapa posterior que comprende su translocación al interior de la célula.

Estos resultados sugirieron analizar la posible interacción inicial del sustrato con algún componente de la envoltura celular, en el paso previo a su translocación o durante la misma. Esta hipótesis condujo, en bacterias, al aislamiento y caracterización de las proteínas de ligado; sin embargo el aporte experimental para la sustentación de la misma en organismos evolutivamente más avanzados, como las levaduras, resulta definitivamente escasa.

Para investigar la posible localización de un componente celular particular, que cumpliera la función de reconocimiento, se llevaron a cabo los ensayos de incorporación de L-leucina en protoplastos de levadura. La presencia de un componente de ligado en el espacio periplasmático, o su asociación con la pared celular se pondría de manifiesto ya que se perdería como consecuencia de la transformación de las células en protoplastos. Esta pérdida impediría una normal interacción del soluto con la/s molécula/s translocadora/s, que en última instancia, determinaría una deficiencia en el proceso de transporte. Al mismo tiempo, la preparación de protoplastos evita el inconveniente de la pérdida de una serie de metabolitos solubles involucrados en el metabolismo energético celular, que se produce durante el proceso de choque osmótico, otra estrategia utilizada para el aislamiento de proteínas del espacio periplasmático, que resulta acompañado por una significativa caída del consumo de oxígeno.

La técnica empleada para la digestión de la pared celular, mostró una eficiente transformación de las células en protoplastos, los que presentaron una capacidad apropiada para llevar a cabo la incorporación de L-leucina.

En la entrada del aminoácido en protoplastos se determinó, como en células enteras, la existencia de una etapa inicial de ligado seguida de otra de translocación, y en forma análoga a lo realizado previamente con células enteras, se llevó a cabo el análisis cinético de las mismas.

En la etapa de translocación se verificó la existencia de dos sistemas similares a los descritos en células enteras. De la comparación de sus parámetros cinéticos, K_T y J_M , se desprende que las entidades responsables del proceso de translocación se hallan íntimamente asociadas con la membrana citoplasmática y que no requieren, al menos en forma indispensable, de ningún elemento de la pared celular o del espacio periplasmático, ya que los valores de esos parámetros resultan similares en células enteras y protoplastos. Estos resultados son coincidentes con los de Nishimura y colaboradores (1982) para el transporte de tiamina, proceso en el cual la proteína de ligado no parece ser un componente esencial.

Asimismo la descripción de la persistencia de los valores de K_T para la translocación de L-leucina, en células de S. carlsbergensis sometidas a choque osmótico sustentan esta idea. (Wainer, 1985).

En la etapa de ligado los dos sistemas respondieron en forma distinta. Se encontró un aumento de la constante de afinidad del sistema S_I (K_{dI}) al transformar las células en protoplastos. Esto pone en evidencia una pérdida de afinidad para el ligado de ese sistema, lo cual se podría asociar a la pérdida de algún componente del espacio periplasmático. Su participación estaría relacionada con un funcionamiento más apropiado del sistema de mayor afinidad

aunque no sería indispensable para llevar a cabo la incorporación del aminoácido por la célula.

Por otro lado, podemos considerar que los sitios a los cuales se ligaría el aminoácido estarían asociados a la membrana plasmática, ya que su número es similar en células enteras y protoplastos, evidenciando una íntima relación entre las etapas de ligado y translocación.

Si se acepta la independencia de los sistemas transportadores, cabría esperar respuestas distintas frente a agentes capaces de modificar el transporte de L-leucina. Esta hipótesis se estudió en los experimentos subsiguientes.

Con tal fin las experiencias se llevaron a cabo con distintas concentraciones externas de L-leucina. El sistema S₁ se ensayó con L-leucina 0,05 mM. y el sistema S₂ con L-leucina 1,0 mM., concentraciones elegidas a partir de los parámetros cinéticos, que permiten considerar que las respuestas obtenidas en cada caso reflejan la operación de un determinado sistema.

Los ensayos de incorporación en distintas condiciones energéticas, no ofrecieron elementos que permitieran establecer diferencias operacionales entre los dos sistemas descritos, de lo cual se infiere que los mismos utilizarían idéntico mecanismo para el acoplamiento de la energía al transporte, supuestamente el gradiente de potencial electroquímico de membrana.

Con idéntico propósito se ensayaron reactivos de grupos tioles, cuya participación en procesos de transporte ha sido frecuentemente mencionada (Fox y Kennedy, 1965; Anraku, 1968a; Kaback y Patel, 1978; Cohn y col. 1981; Ramos y col. 1983). Mediante el uso de derivados de distinta

penetrabilidad, en células enteras y protoplastos, es posible encarar el problema de la localización de distintos componentes del sistema de transporte y evidenciar la participación de elementos del espacio periplasmático.

En relación con las distintas respuestas observadas en células y protoplastos de las dos cepas empleadas, es necesario considerar que para la interpretación de los efectos producidos, debe tenerse en cuenta el hecho de que, en la membrana celular, la accesibilidad de los grupos tioles puede estar modulada por complejos mecanismos, los cuales varían en función de distintas condiciones que podrían determinar por ejemplo, cambios conformacionales en las proteínas. Al respecto se ha propuesto (Cohn y col. 1981) que la reactividad o accesibilidad de los grupos sulfhidrilo resulta alterada por modificaciones en el $\Delta\mu_H^+$, así como una posible interconversión ditiol-disulfuro (Robillard y Konings, 1982) que produciría modificaciones estructurales y una restricción de su reactividad.

La NEM mostró efectos estimulatorios o inhibitorios en función de la concentración externa empleada. Las estimulaciones fueron significativamente menores en células enteras, inclusive después de su tratamiento con un agente reductor. Fue posible detectar diferencias netas entre las translocaciones de los dos sistemas, ya que el sistema S_1 resultó más sensible que el sistema S_2 , alcanzando en la cepa silvestre mayor respuesta que en la cepa mutante. En base a estas observaciones es posible sugerir que el reactivo es capaz de interactuar con algún componente indispensable del sistema de transporte, generando a través de este hecho su activación específica. El escaso efecto estimulatorio observado en células enteras parece demostrar

que durante la preparación de los protoplastos el componente reactivo resulta sensibilizado. Un eventual mecanismo para esta sensibilización, podría representarlo su reducción por el tratamiento realizado con DTT, previo a la incubación de las células con la enzima responsable de la digestión de la pared celular. No obstante, esta posibilidad resulta descartable, ya que no se detectaron efectos de este reactivo sobre el transporte ni sobre la respuesta de las células a la NEM.

Esta presunta acción local de la NEM sobre la translocación, podría permitir su empleo como reactivo para el marcado de componentes del transporte, con el objeto de conseguir su aislamiento y posterior caracterización según se describiera con la permeasa de lactosa en E.coli.

Resulta interesante mencionar que se han descrito estimulaciones del transporte por esta maleimida, como es el caso del sistema de alta afinidad sodio independiente del transporte de L-leucina en células de hígado Chang (Takadera y Mohri, 1982), el cual resulta dependiente de la concentración de aminoácido empleada. También se detectaron efectos inhibitorios en el transporte de L-leucina en S.cerevisiae, no bloqueados por la presencia de un exceso de aminoácido (Ramos y col. 1983). En relación con la inhibición observada a concentraciones más elevadas de reactivo, éstas pueden claramente asociarse con un déficit en el aporte energético requerido para llevar a cabo la acumulación del aminoácido, puesto que la adición de NEM, en estas concentraciones, produce una rápida inhibición de la respiración celular, parámetro definitivamente asociado con el metabolismo energético celular.

Los ensayos con la NFM, un derivado más hidrofóbico que la NEM, evidenciaron respuestas distintas en las cepas ensayadas. Este hecho sugiere la existencia de diferencias a nivel de membrana, que podrían aparecer como consecuencia de la mutación. La modificación de características de superficie, e inclusive de procesos de transporte, se ha descrito en células con deficiencias mitocondriales como las cepas "petite", sugiriendo un posible control mitocondrial sobre genes nucleares involucrados en procesos como aglutinación por concanavalina A, floculación, resistencia a drogas e inclusive la capacidad de incorporar algunos azúcares, procesos afectados en este tipo de células (Evans y col. 1983). Por lo tanto, es posible considerar que la mutación que posee la cepa JB64, y que afecta la función mitocondrial, podría producir alteraciones a nivel de la superficie celular y por lo tanto afectar procesos tan íntimamente relacionados con ésta como es la incorporación de aminoácidos.

Por otro lado, la utilización de NFM permitió diferenciar los sistemas de transporte, ya que fue capaz de generar, alternativamente, estimulaciones o inhibiciones sobre la entrada de L-leucina, sin afectar la respiración celular. Estos hechos, comparados con los obtenidos con NEM sugieren la participación, en forma directa o indirecta, de distintos grupos sensibles a los reactivos de grupos tioles que pueden hallarse en entornos de distinta accesibilidad y por lo tanto, reaccionar eficazmente con determinados reactivos que sean capaces de alcanzar esos entornos.

La comparación de los resultados obtenidos con NFM entre células enteras y protoplastos, muestra que los

ligados de las primeras no resultan afectados y las translocaciones son menos sensibles que en protoplastos. Esto permite sugerir que los grupos sensibles no se pierden al llevar a cabo la digestión de la pared celular, tal cual se concluyó por el estudio de la acción de la NEM.

Más aún, es posible considerar que la presencia de la pared celular y el espacio periplasmático podrían resultar un impedimento para el acceso de los reactivos a su sitio de acción. Además, en los protoplastos, la membrana citoplasmática se halla expuesta al medio de reacción y por lo tanto, un reactivo como la NFM, accederá fácilmente a entornos hidrofóbicos para reaccionar con los grupos sensibles allí localizados.

Otro hecho experimental que sustenta la posible independencia de los sistemas de transporte, precisamente la etapa del ligado, surge del efecto inhibitorio observado con el FMA. Este reactivo permite discriminar entre ambos sistemas, ya que es posible observar, en ambas cepas, la inhibición del ligado del sistema S₂ sin afectar al sistema S₁. Asimismo, la respiración celular fue insensible a la presencia del FMA en las condiciones experimentales ensayadas.

Existe suficiente evidencia experimental que indica que la organización molecular de las membranas es asimétrica. La disponibilidad de un reactivo para grupos tioles, incapaz de atravesar la membrana citoplasmática, resulta una herramienta útil para investigar la orientación de los grupos sensibles a estos reactivos. Mediante el empleo de GSMAL I en ensayos de entrada de L-leucina, sería posible detectar la presencia de grupos tioles orientados hacia la cara externa de la membrana celular invo-

lucrados en el mecanismo de incorporación de este aminoácido. Los resultados obtenidos con este reactivo permiten considerar que estos grupos, sensibles a las maleimidas, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la célula, ya que en ninguna de las condiciones experimentales empleadas se detectaron modificaciones de la entrada del aminoácido.

Por lo tanto, y considerando los resultados previos de Ramos y colaboradores (1983), que indican que los grupos tioles-NEM reactivos no se hallan localizados en el sitio activo del transportador, las evidencias experimentales presentadas en esta tesis sugieren que algunos efectos inhibitorios sobre la entrada de L-leucina podrían implicar mecanismos adicionales a la interacción directa de los reactivos con el transportador. En este contexto parece razonable asumir que la inhibición involucra la inactivación de procesos metabólicos que favorezcan la incorporación del aminoácido. Asimismo es posible considerar la existencia de distintos grupos sensibles, que si bien no se hallan localizados en el sitio activo del transportador, al reaccionar con los distintos reactivos serían capaces de inducir en éste algún tipo de cambio que modificarían su funcionamiento.

La acidificación del medio extracelular, luego de la adición de determinados sustratos a suspensiones de levaduras, ha sido observada durante décadas, aunque la razón de esa acidificación permanecía sin esclarecerse. Fue relacionado con la producción y extrusión de metabolitos ácidos intracelulares con el objeto de eliminar el exceso de acidez del interior de la célula. También se propuso que dicho proceso representaría una capacidad de amortiguar

el medio externo, que en cierto modo guardaría similitud con la homeostasis de los organismos superiores. Más recientemente fue asociada con el transporte activo secundario de sustratos tales como glúcidos, aminoácidos o purinas, a expensas de la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones generado a través de la membrana citoplasmática.

Se ha propuesto que la H^+ -ATPasa de membrana citoplasmática está íntimamente involucrada en la creación de dicho gradiente (Scarborough, 1977; Serrano, 1978; Van Den Broeck y col. 1982; De la Peña y col. 1982). La actividad de esa enzima depende del contenido de ATP intracelular y presenta alta especificidad para dicho sustrato, requiere cationes divalentes (Mg^{2+}), su pH óptimo es 5,6-5,7 y es activada reversiblemente por D-glucosa, modificando su pH óptimo a 6-7 por un mecanismo que aún no ha sido definitivamente aclarado (Serrano, 1983).

Es posible proponer que el transporte activo de L-leucina se lleva a cabo a expensas del gradiente de protones, de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica (Mitchell, 1963) y definir el potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_H^+$) como la fuerza protonmotriz impulsora del transporte, mediante un mecanismo de cotransporte protón-aminoácido (Seaston y col. 1973).

Cabe entonces esperar que alteraciones en dicho gradiente afectarán la capacidad transportadora de la célula y por lo tanto, la medida de este potencial representaría un valioso aporte para la sustentación de esta idea. Con tal fin, se llevaron a cabo los ensayos destinados a establecer la magnitud de dicho gradiente y las modificaciones alcanzadas, en las condiciones experimentales empleadas en

el estudio de la incorporación de L-leucina.

A partir de la distribución intra-extracelular de ácidos débiles fue posible evaluar el pH intracelular (Rotenberg, 1979), a partir del cual se determinó el ΔpH como la diferencia entre éste y el pH del medio de incubación.

El objetivo fue establecer una correlación entre las variaciones de la entrada de L-leucina, observadas en las distintas condiciones metabólicas, y un parámetro del gradiente electroquímico de protones. De acuerdo con distintos autores (De la Peña y col. 1982; Van den Broeck y col. 1982) a pH 4,5 el gradiente de pH sería el componente principal del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ y por lo tanto su medida reflejaría, en forma apropiada, variaciones producidas a nivel del potencial de membrana.

La determinación del pH y del ΔpH , por la técnica empleada, deben ser consideradas como aproximaciones razonables más que como determinaciones absolutas, ya que asumimos como válido que: a) la constante de disociación del ácido es idéntica dentro y fuera de la célula; b) el agua intracelular en su totalidad resulta disponible para la solubilización del ácido, y a partir de ella calculamos su concentración intracelular; c) el ΔpH representa la diferencia de valores de pH entre el pH intracelular calculado y el pH de la solución de trabajo que resulta prefijado por el amortiguador.

No obstante, los valores obtenidos resultan coincidentes con los publicados recientemente y en los cuales se llevaron a cabo medidas de pH intracelular y perfiles de pH transmembrana por microscopía de fluorescencia (Slavik y Kotyk, 1984) y por distribución de dimetiloxazolidina o ruptura de células por congelamiento y descongelamiento

rápido (Van Den Broeck y col. 1982).

Las determinaciones presentadas permiten establecer inequívocas relaciones entre el Δ pH, el estado metabólico celular y la entrada de L-leucina en levaduras, organismo sobre el cual la información disponible hasta el presente en este campo resulta escasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el ácido benzoico, en un amplio rango de concentraciones, permite evaluar el pH celular. En contraste, el ácido propiónico sería rápidamente metabolizado por la célula (Ramos y col. 1969) y en consecuencia su empleo para esta determinación no resulta apropiado.

El equilibrio de distribución del ácido benzoico en células ayunadas, permitió establecer un valor de pH intracelular y consecuentemente un Δ pH. Estos valores resultaron significativamente incrementados por: a) el agregado de D-glucosa o etanol al medio de incubación; b) la preincubación de las células con estos sustratos. En estas condiciones se determinaron desplazamientos del equilibrio de distribución de acuerdo con las variaciones del estado metabólico celular. El incremento del Δ pH se puede correlacionar, en forma inmediata, con las variaciones observadas en la incorporación de L-leucina. En células ayunadas, el gradiente existente resulta insuficiente para llevar a cabo una activa incorporación de aminoácidos y por lo tanto la velocidad de entrada del mismo resulta baja. El agregado de un sustrato metabolizable, genera un incremento significativo del gradiente de potencial, creando una fuerza impulsora para el transporte y produce un sustancial aumento de la velocidad de incorporación.

Paralelamente, el Δ pH establecido en células preincu

badas, resultó de igual magnitud que el alcanzado por el agregado del sustrato al medio de ensayo, esto determina que la velocidad de incorporación de L-leucina sea varias veces mayor que en células ayunadas.

Al analizar los resultados obtenidos con células de la cepa silvestre, queda establecido que los dos sustratos ensayados como fuente de energía, resultan igualmente eficientes para incrementar el ΔpH , el pH intracelular alcanza valores análogos y el tiempo requerido para dicho incremento es similar. No obstante, en los ensayos de incorporación de L-leucina se determinó que las células preincubadas con D-glucosa presentan mayor capacidad que las preincubadas con etanol para llevar a cabo la incorporación del aminoácido. Ya que en estos casos los valores de ΔpH no presentan diferencias, es posible considerar que la D-glucosa sería capaz de poner en marcha algún otro mecanismo que le permite a la célula, llevar a cabo una incorporación más eficiente del aminoácido sin estar involucrado el ΔpH , y sugiere que la incorporación de L-leucina no resulta regulada exclusivamente por el gradiente de protones.

Además en células preincubadas es posible estimular la incorporación del aminoácido por el agregado de sustratos metabolizables al medio de incubación lo que tampoco provoca variaciones en el ΔpH y pone en evidencia la existencia de algún otro proceso generado por la metabolización "in situ" de las fuentes de energía.

Con células de la cepa mutante JB64 también se verificó que el etanol es capaz de establecer un incremento de los valores de pH intracelular, análogo al producido por la D-glucosa, no obstante, este proceso se lleva a cabo en forma más lenta. Esta observación demuestra que para

generar un aumento del gradiente de protones es necesaria la metabolización del sustrato. A través de su metabolización proveería el ATP requerido por la H^+ -ATPasa de membrana citoplasmática para llevar a cabo un bombeo activo de protones hacia el exterior de la célula. En esta cepa mutante, la D-glucosa es capaz de proveer el ATP a través de la vía glucolítica, pero el etanol sólo podrá proveer ATP al citoplasma en forma restringida como consecuencia de su deficiencia en el translocador ATP/ADP mitocondrial, por lo tanto, el incremento del ΔpH se produce lentamente. Asimismo, esta observación permite justificar la pobre o nula estimulación de la incorporación de L-leucina mediada por el etanol, en esta cepa, durante intervalos de tiempo inferiores a diez minutos, y la aparición de estos efectos en las células que han sido preincubadas durante quince minutos con etanol. En este intervalo, su lenta oxidación permite establecer el gradiente a expensas del cual se realiza la entrada del aminoácido.

Se ha comentado que la acción inhibitoria sobre la entrada de L-leucina producida por el DNP, resulta una consecuencia del desacople de la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial y por el colapso del gradiente de pH de membrana citoplasmática. Su utilización en el estudio del ΔpH permitió corroborar esta última afirmación, ya que el agregado de DNP a células preincubadas mostró un rápido descenso del ΔpH , que de acuerdo con lo expuesto anteriormente, justifica la inhibición observada sobre el transporte.

Paralelamente, resultados presentados sobre el efecto inhibitor de reactivos de grupos tioles sobre la ATPasa de membrana citoplasmática de levaduras *S.cerevisiae*

(Serrano, 1978) sugirieron estudiar el efecto de la NEM sobre el ΔpH .

Las experiencias llevadas a cabo establecieron que es te reactivo en altas concentraciones (1 mM) provoca un descenso del pH intracelular que se corresponde con una caída de la disponibilidad de energía necesaria para el mantenimiento del gradiente y la inhibición de la enzima responsable de su generación, ya que en estas condiciones el reactivo es capaz de inhibir el eflujo de protones (C. Stella comunicación personal). Este efecto permite considerar otra posible causa indirecta de la acción inhibitoria de este tipo de reactivos sobre el proceso de transporte. No obstante no descarta la eventual acción directa sobre las entidades transportadores, ya que concentraciones menores de NEM no produjeron modificaciones del ΔpH .

Es conveniente aclarar que el proceso en estudio tam bién depende del potencial eléctrico transmembrana, $\Delta \Psi$, (Jaspers y Van Steveninck, 1977).

Este componente del $\Delta \mu_{\text{H}}^+$ resulta difícil de medir en levaduras en forma apropiada, el pequeño tamaño de las células impide el empleo de métodos directos como el uso de microelectrodos; por otro lado el empleo de cationes lipofílicos, como el tetrafenilfosfonio, han aportado resultados muy contradictorios, que han impedido extraer conclusiones definitivas. No obstante, debemos considerar que algunos reactivos, como es el caso de los protonóforos causan descensos de los valores de ΔpH y el $\Delta \Psi$ puede no resultar afectado, esto indica que probablemente para com pensar la despolarización causada por el influjo de protones, sea extruído otro ión, presumiblemente potasio, y a

expensas de ese $\Delta\psi$, componente menor del $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ a pH 4,5, se lleve a cabo una entrada de L-leucina a baja velocidad.

CONCLUSIONES

1. Las células de S.cerevisiae son capaces de incorporar L-leucina. La metabolización de sustratos generadores de energía, ya sea en forma previa, células energizadas, o simultánea con el proceso de incorporación, produce una sustancial estimulación de la incorporación y pone de manifiesto su capacidad concentrativa de alta eficiencia.
2. El déficit mitocondrial de la cepa JB64 impide una apropiada metabolización del etanol, por lo que no se observa estímulo sobre la entrada de L-leucina en esta cepa por su consumo en forma simultánea. La capacidad de este sustrato para estimular la incorporación de L-leucina se pone claramente en evidencia en la cepa silvestre JB65.
3. En la entrada de L-leucina se distinguen dos etapas, una de ligado y otra de translocación del aminoácido a través de la barrera de permeabilidad. La primera etapa sólo es estimulada por la preincubación de las células con D-glucosa, en cambio la translocación se incrementa con D-glucosa o etanol.
4. El análisis cinético de la translocación, en las dos cepas estudiadas, muestra la existencia de dos sistemas cinéticamente caracterizados como sistema S_1 , de alta afinidad y baja velocidad máxima, y sistema S_2 , de baja afinidad y alta velocidad máxima.

5. La energización de las células de ambas cepas, por preincubación con D-glucosa o etanol, produce un incremento de las velocidades máximas, sin afectar significativamente las constantes de afinidad.
6. El análisis del ligado de L-leucina a las células también indica la existencia de dos sistemas, que operan en el rango de concentraciones de los sistemas translocadores y denominados, por extensión, sistema S_1 y sistema S_2 .
7. La energización con D-glucosa produce un incremento del número de sitios de ligado del sistema S_1 que no se verifica por preincubación con etanol.
8. Por digestión de la pared celular es posible obtener protoplastos de levaduras capaces de llevar a cabo la incorporación concentrativa de L-leucina. En éstos se evidencian las etapas de ligado y translocación y es posible realizar sobre ellas un estudio cinético.
9. En protoplastos también se observa el funcionamiento de dos sistemas de translocación cuyos parámetros cinéticos son similares a los determinados en células enteras. Esto permite considerar que las entidades responsables de este proceso se hallan íntimamente asociadas a la membrana citoplasmática.
10. En el ligado se verifica la persistencia de los dos sistemas definidos en células enteras, aunque la relativa

pérdida de afinidad del sistema S_1 permite considerar la participación de algún elemento no esencial de la pared celular o del espacio periplasmático.

No obstante, los sitios de ligado se hallan íntimamente asociados a la membrana citoplasmática, ya que su número no difiere significativamente entre células enteras y protoplastos.

11. El empleo de reactivos de grupos tioles permite establecer la presencia de distintos sitios sensibles en componentes del sistema de transporte de L-leucina. Estos sitios no se pierden al transformar las células en protoplastos y permiten establecer diferencias entre los dos sistemas cinéticamente caracterizados y entre las etapas de ligado y translocación. Asimismo, la falta de efectos de un reactivo no penetrante, indica que los sitios sensibles no se hallan orientados hacia la superficie externa de la barrera de permeabilidad.
12. El estudio de la distribución intra-extracelular de ácido benzoico permite determinar el valor de pH intracelular, y a partir de éste el ΔpH . Tanto la preincubación como el consumo simultáneo de sustratos generadores de energía producen incrementos del ΔpH , que se correlacionan con los efectos producidos por estos sustratos sobre la incorporación de L-leucina. Por lo tanto, es posible considerar que el gradiente de concentración de protones, a través de la membrana citoplasmática, como parte del $\Delta \mu_H^+$, constituye una fuerza impulsora del transporte de L-leucina en estas células.

13. La metabolización de los sustratos energéticos proveerían el ATP requerido por la H^+ ATPasa de membrana citoplasmática, para realizar un bombeo activo de protones hacia el exterior de la célula y establecer los incrementos de ΔpH . En la cepa mutante JB64 la metabolización de la glucosa por la vía glucolítica es capaz de proveer el ATP requerido, mientras que el etanol sólo podrá proveerlo en forma restringida como consecuencia de la deficiencia en el translocador ATP/ADP mitocondrial. Por lo tanto, el incremento del ΔpH se produce lentamente y en consecuencia la estimulación de la incorporación de L-leucina es escasa o nula por el consumo simultáneo de etanol, durante los primeros minutos de incubación y se aprecia en forma significativa en células preincubadas.
14. La modificación del equilibrio de distribución del ácido benzoico, producida por el protonóforo 2,4-dinitrofenol, permite considerar que su efecto inhibitorio sobre la incorporación de L-leucina se produce como consecuencia del colapso del ΔpH de membrana citoplasmática.
15. La mayor velocidad de incorporación observada por preincubación de las células con D-glucosa, respecto de la preincubación con etanol y el efecto de aquella sobre los valores del ligado, no se pueden atribuir a diferencias en el ΔpH ya que ambos sustratos producen idénticos incrementos sobre este parámetro; por lo tanto, es posible considerar algún otro efecto de la D-glucosa sobre el transporte de L-leucina, además de su utilización como fuente de energía.

RESUMEN

El estudio de la incorporación de L-leucina en levaduras *S.cerevisiae*, cepas silvestre JB65 y mutante deficiente en el translocador ATP/ADP mitocondrial JB64, permitió establecer que la metabolización de sustratos generadores de energía son capaces de estimular el proceso de incorporación del aminoácido. Asimismo, en células energizadas por preincubación con D-glucosa o etanol, la incorporación de L-leucina es significativamente mayor que en células ayunadas, y resulta inhibida por el protonóforo 2,4-dinitrofenol.

En la medida de la entrada del aminoácido a la célula se distinguen dos etapas, una de ligado y otra de translocación a través de la barrera de permeabilidad.

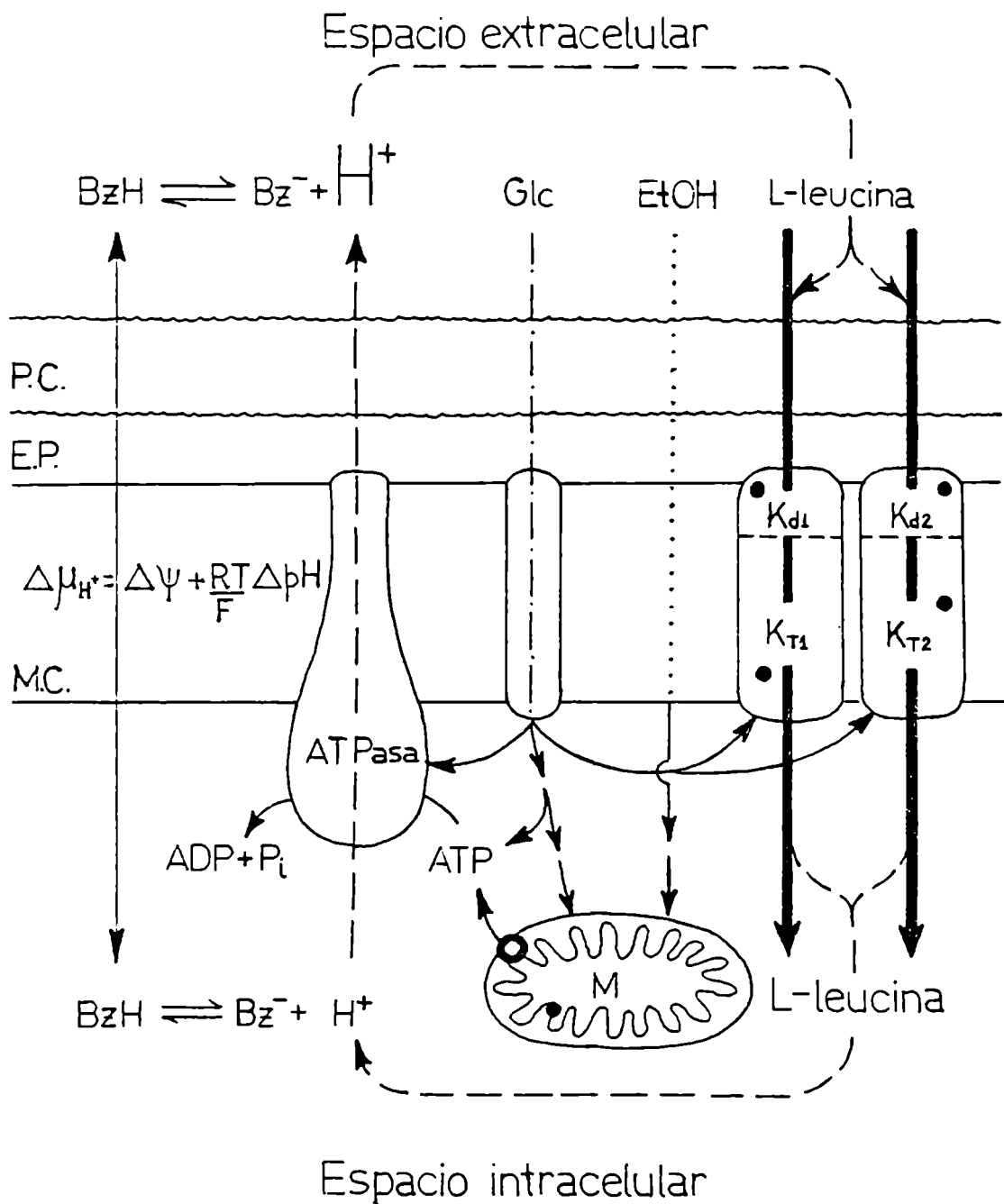
El estudio cinético de la translocación señala la existencia de dos sistemas definidos como sistemas S_1 , de alta afinidad y baja velocidad máxima, y sistema S_2 , de baja afinidad y alta velocidad máxima. Como respuesta a la energización se produce un incremento en las velocidades máximas, sin verificarse variaciones en las constantes de afinidad. En la etapa de ligado se determinó la existencia de dos poblaciones de sitios de unión, que operan en el rango de concentraciones de los sistemas de translocación y se definieron, por extensión, S_1 y S_2 . La energización por preincubación con D-glucosa produce un incremento del número de sitios de unión en el sistema S_1 (N_1).

Por digestión enzimática de la pared celular, se obtuvieron protoplastos de levadura de las dos cepas en estudio, verificándose su capacidad para llevar a cabo la incorporación de L-leucina. En protoplastos se estableció la existencia de los dos sistemas de translocación y de ligado definidos en células enteras. La comparación de los parámetros

cinéticos calculados en protoplastos, con los calculados en células enteras, sugieren que los componentes esenciales para el ligado y la translocación que determinan los valores de dichos parámetros, se hallan íntimamente asociados a la membrana citoplasmática; no se pierden al llevar a cabo la digestión de la pared celular.

Por otro lado, el estudio de los efectos de reactivos de grupos tioles sobre la entrada de L-leucina en células enteras y protoplastos, permitió establecer la participación de distintos grupos sensibles a estos compuestos, distinguiéndose, por su respuesta diferencial, las etapas de ligado y translocación de los dos sistemas. No se detectaron sitios sensibles orientados hacia el medio externo y mediante el empleo de reactivos capaces de penetrar a través de la barrera de permeabilidad se observaron estimulaciones e inhibiciones de la incorporación de L-leucina. En algunos casos, los efectos inhibitorios se relacionaron con un déficit en el aporte energético ya que se verificaron inhibiciones de la respiración celular, concomitantes con la inhibición de la entrada del aminoácido.

Finalmente, se evaluó el gradiente de pH de membrana citoplasmática mediante el estudio de distribución intra-extracelular de ácido benzoico. Se puso en evidencia que por consumo de sustratos generadores de energía se produce un incremento del ΔpH , que como parte del $\Delta \mu_H^+$, constituye la fuerza impulsora del transporte. Esto permite interpretar, en términos de la hipótesis quimiosmótica, la estimulación observada sobre la entrada de L-leucina por el etanol y la D-glucosa y el efecto inhibitorio del 2,4-dinitrofenol, reactivo que produjo un colapso de dicho gradiente.



————— Incorporación de L-leucina; ———— Incorporación de ácido benzoico (BzH); —. —. — Incorporación de D-glucosa (Glc); Incorporación de etanol (EtOH); —> —> Metabolización intracelular; • Grupos tioles; ○ Translocador ATP/ADP mitocondrial; K_d : Constante de afinidad de ligado; K_T : Constante de afinidad de translocación; M.: Mitochondria; M.C.: Membrana citoplasmática; E.P.: Espacio periplasmático; P.C.: Pared celular.

Dra. Eugenia H. Ramos
 PROF. ORD. ADJUNTO
 A CARGO DE LA CATEDRA
 DE QUÍMICA BIOLÓGICA

REFERENCIAS

- Abbott R.E. y Schachter D. (1976) *J.Biol.Chem.* 251, 7176-7183.
- Adler J. y Epstein W. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 71, 2895-2899.
- Adler J. (1975) *Ann.Rev.Biochem.* 44, 341-356.
- Ahlem C., Huisman W., Neslund G. y Dahms A.S. (1982) *J.Biol. Chem.* 257, 2926-2931.
- Alvarado F. (1966) *Science* 151, 1010-1017.
- Anraku Y. (1968a) *J.Biol.Chem.* 243, 3116-3123.
- Anraku Y. (1968b) *J.Biol.Chem.* 243, 3123-3127.
- Anraku Y. (1968c) *J.Biol.Chem.* 243, 3128-3138.
- Ardeshir F., Higgins C.F. y Ferro-Luzzi Ames G. (1981) *J. Bacteriol.* 147, 401-409.
- Argast M., Ludtke D., Silhavy T.J. y Boos W. (1978) *J. Bacteriol.* 136, 1070-1083.
- Argast M. y Boos W. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 10931-10933.
- Barnett J.A. y Kornberg H.L. (1980) *J.Gen.Microbiol.* 23, 65-71.
- Barts P.W.J.A., Hoeberichts J.A., Klaassen A. y Borst-Pawels G.W.F.A. (1980) *Biochim.Biophys.Acta.* 597, 125-136.
- Beck J.C., Mattoon J.R., Hawthorne D.C. y Sherman F. (1968) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 60, 186-193.
- Benson J.A. y Rampone A.J. (1966) *Ann.Rev.Physiol.* 28, 201-216.
- Boos W., Gordon A.S., Hall R.E. y Price H.D. (1972) *J.Biol. Chem.* 247, 917-924.
- Boxman A.W., Barts P.W.J.A. y Borts-Pawels G.W.F.A. (1982) *Biochim.Biophys.Acta.* 682, 13-18.
- Brandriss M.C. y Magasanik B. (1979) *J.Bacteriol.* 140, 498-503.
- Braun V. y Hantke K. (1981) en *Organization of Procariotic Cell Membranes. Vol. II* (Gosh B.K. editor) C.R.C. Press, Boca Ratón, Fl. pp 1-74.

- Brocklehurst R., Gardner D. y Eddy A.A. (1977) *Biochem.J.* 162, 591-599.
- Bussey H. y Umbarguer H.G. (1970) *J.Bacteriol.* 103, 277-285.
- Chance B. (1959) *J.Biol.Chem.* 234, 3036-3040.
- Christensen M.S. y Cirillo V.P. (1972) *J.Bacteriol.* 110, 1190-1198.
- Chevallier M.R., Jund R. y Lacroute F. (1975) *J.Bacteriol.* 122, 629-634.
- Cirillo V.P. (1961) *Annu. Rev.Microbiol.* 15, 197-223.
- Cirillo V.P. (1968) *J.Bacteriol.* 95, 603-609.
- Clark A.F. y Hogg R.W. (1981) *J.Bacteriol.* 147, 920-924.
- Cockburn M., Earnshaw P. y Eddy A.A. (1975) *Biochem.J.* 146, 705-712.
- Cohen G.N. y Rickenberg H.V. (1956) *Ann.Inst.Pasteur.* 91, 693-700.
- Cohen G.N. y Monod J. (1957) *Bacteriol.Revs.* 21, 169-194.
- Cohn D.E., Kaczorowski G.J. y Kaback H.R. (1981) *J.Biol. Chem.* 256, 3308-3313.
- Conway E.J. y Downey M. (1950) *Biochem.J.* 47, 347-351.
- Cooper T.G. y Lawther R.P. (1973) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 70, 2340-2346.
- Crabeel M. y Grenson M. (1970) *Eur.J.Biochem.* 14, 197-204.
- Crane R.K. (1960) *Physiol.Revs.* 40, 789-817.
- Cross R.L. (1981) *Annu.Rev.Biochem.* 50, 681-714.
- Cuppoletti J. y Segel I.H. (1974) *J.Membr.Biol.* 17, 239-244.
- Darnwalla K.R., Paxton T. y Henderson P.J.F. (1981) *Biochem. J.* 200, 611-627.
- Darte C. y Grenson M. (1975) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 67, 1028-1033.
- Davies L., Folkes J.P., Gale E.F. y Bigger L.C. (1953) *Biochem.J.* 54, 430-435.

- Davis B.D. (1956) H. Ford. Hospital Intern. Symps. (O.H. Gaebler editor) Acad.Press. N.Y.
- De Busk B.G. y De Busk A.G. (1965) Biochim.Biophys.Acta. 104, 139-146.
- De la Peña P., Barros F., Gascón S., Lazo P.S. y Ramos S. (1981) J.Biol.Chem. 526, 10420-10425.,
- De la Peña P., Barros F., Gascón S., Ramos S. y Lazo P.S. (1982) Eur.J.Biochem. 123, 447-453.
- Diamond J.M. y Wright E.M. (1969) Proc. Royal Society Series B. 172, 273-280.
- Dills S.S., Apperson A., Schmidt M.R. y Saier M.H. (1980) Microbiol.Rev. 44, 385-418.
- Doudoroff M. (1951) en Phosphorous Metabolism (Mc. Elroy W. D. y Glass B. editores) The Johns Hopkins Press, Baltimore, pp 1-42.
- Dreyfuss J. y Pardee A.B. (1966) J. Bacteriol. 91, 2275-2280.
- Dürr M., Ureck K., Boller Th., Wiemken A., Schwencke J. y Nagy M. (1979) Arch.Microbiol. 121, 169-175.
- Eaton N.R. (1960) Arch.Biochem.Biophys. 88, 17-25.
- Eddy A.A. (1966) en Proceedings of the Second Symposium on Yeast. (A. Kocková-Kratochvilová editor) Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
- Eddy A.A., Inge K.J., Backen K. y Nowacki J.A. (1970) Biochem. J. 120, 845-851.
- Eddy A.A. y Nowacki J.A. (1971) Biochem.J. 122, 701-711.
- Eddy A.A., Philo R., Earnshaw P. y Brocklehurst R. (1977) en Biochem. of Membr. Transport. FEBS Symp. 42 (Semenza G. y Carafoli E. editores) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg y Nueva York. pp. 250-260.
- Eddy A.A. (1978) Current Topics in Membranes and Transport. 10, 279-293.
- Eddy A.A. (1982) Adv.Microbiol.Physiol. 23, 1-78.
- Eraso P., Mazón M.J. y Gamcedo J.M. (1984) Biochim.Biophys. Acta. 778, 516-520.

- Evans I.H., Diala E.S., Earl A. y Wilkie D. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* 602, 201-206.
- Fox C.F. y Kennedy E.P. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 891-899.
- Fox C.F., Carter J.R. y Kennedy E.P. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 698-705.
- Fowler P.M., Bell A.J.S. y Griffiths D.E. (1972) *Can. J. Biochem.* 50, 35-43.
- Franzusoff A.J. y Cirillo V.P. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614.
- Fuhrman G.F., Boehm C. y Theuvenet A.P.R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 433, 583-589.
- Furlong C.E. y Schellenberg G.D. (1980) en *Microorganisms and Nitrogen Sources* (Payne J.W. editor) John Willey and Sons pp. 89-123.
- Gale E.F. (1947) *J. Gen. Microbiol.* 1, 53-56.
- Garavito S.M. y Rosenbusch J.P. (1980) *J. Cell. Biol.* 86, 327-329.
- Gibson Q.M. y Wiseman G. (1951) *Biochem. J.* 48, 426-431.
- Gilson E., Higgins C.F., Hofnung M., Ferro-Luzzi Ames G. y Nikaido H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9915-9918.
- Gits J.J. y Grenson M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135, 507-516.
- Goodwin C.D., Baccavage W.X. y Mattoon J.R. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 413-420.
- Grenson M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 127, 339-346.
- Grenson M., Hou C. y Crabeel M. (1970) *J. Bacteriol.* 103, 770-777.
- Grenson M. y Hennaut C. (1971) *J. Bacteriol.* 105, 477-483.
- Grenson M. y Hou C. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 749-756.
- Grenson M. y Acheroy B. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 188, 261-265.
- Grenson M. (1983) *Eur. J. Biochem.* 133, 135-140.

- Grenson M. (1983) *Eur.J.Biochem.* 133, 141-144.
- Haldane J.B.S. (1954) *Neur.Biol.* 16, 12-19.
- Halvorson H.O. y Cohen G.N. (1958) *Ann. Inst.Pasteur.* 94, 73-79.
- Harwood J.P., Gazdar G., Prasad G., Kotyk P.A., Curtis S.J. y Epstein W. (1976) *J.Biol.Chem.* 251, 2464-2468.
- Higgins C.F., Hoog P.D., Nikaido K., Ardeshir F., Garcia G., Ferro-Luzzi Ames G. (1982) *Nature.* 298, 723-727.
- Holzer H. (1976) *TIBS* 1, 178-180.
- Housset P., Nagy M. y Schwencke J. (1975) *J.Gen.Microbiol.* 16, 261-266.
- Hunter D.R. y Segel I.H. (1973) *Arch.Biochem.Biophys.* 154, 387-399.
- Indge K., Seaston A. y Eddy A.A. (1977) *J.Gen.Microbiol.* 99, 243-255.
- Iwashima A. y Nishimura H. (1979) *Biochim.Biophys.Acta.* 577, 217-220.
- Janick P.A., Grunwald G.D. y Wood J.M. (1977) *Biochim.Biophys. Acta.* 464, 328-337.
- Jeanjean R. y Fournier L. (1979) *FEBS lett.* 105, 163-166.
- Jeanjean R., Bedu S., Attia A. et F. y Rocca-Serra (1982) *Biochimie.* 64, 163-166.
- Jones T.H.D. y Kennedy E.P. (1969) *J.Biol.Chem.* 244, 5981-5987.
- Jund R., Chevallier M.R. y Lacroute F. (1977) *J.Membr.Biol.* 36, 233-239.
- Kaback H.R. y Patel C. (1978) *Biochemistry.* 17, 1640-1646.
- Kaczorowski G.J., Le Blum G. y Kaback H.R. (1980) *Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 77, 6319-6323.
- Kakinuma Y., Oshumi Y. y Anraku Y. (1981) *J.Biol.Chem* 256, 10859-10864.
- Karst F. y Jund R. (1976) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 71, 535-541.

- Kellerman O. y Szmelenman S. (1974) *Eur.J.Biochem.* 47, 139-149.
- Kepes A. y Cohen G.N. (1962) en *The Bacteria* (Gunsalus I. C. y Stainer R.Y. editores) Vol. 5. Academic Press. New York pp 179-221.
- Kolodrubetz D. y Scheleif R. (1981) *J.Mol.Biol.* 151, 215-227.
- Koshland D.E. (1981) *Annu.Rev.Biochem.* 50, 765-782.
- Kotyk A. y Kleinzeller A. (1967) *Biochim.Biophys.Acta.* 135, 106-114.
- Kotyk A., Ponec M. y Riková C. (1971) *Folia Microbiol.* 16, 432-439.
- Kotyk A. y Michaljanicová D. (1974) *Biochim.Biophys.Acta.* 332, 104-111.
- Kuo S.C., Christensen M.S. y Cirillo V.P. (1970) *J.Bacteriol.* 103, 671-678.
- Kuo S.C. y Cirillo V.P. (1970) *J.Bacteriol.* 103, 679-686.
- Kuznar J., Schwencke J. y Magaña-Schwencke N. (1973) *Biochim. Biophys,Acta.* 318, 273-279.
- Kyte J. (1981) *Nature.* 292, 201-204.
- Lagunas R. y Gancedo J. (1973) *Eur.J.Biochem.* 37, 90-94.
- Lam V.M.S., Darnwalla K.R., Henderson P.J.F. y Jones-Mortiner M.C. (1980) *J.Bacteriol.* 143, 396-402.
- Lauquin G., Vignais P.V. y Mattoon J.R. (1973) *FEBS lett.* 35, 198-200.
- Lehninger A.L. (1964) *The Mitochondrion* W.A. Epstein, Inc. N.Y. pp. 147.
- Magaña-Schwencke N., Kuznar J. y Schwencke J. (1973) *Biochim. Biophys,Acta.* 318, 281-289.
- Mahoney W.C., Hogg R.W. y Hermodson M.A. (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 4350-4356.
- Maitra P.K. y Estabrook R.W. (1967) *Arch. Biochem.Biophys.* 121, 117-128.
- Matile P., Moor H. y Muhlethaler K. (1967) *Arch.Microbiol.* 58, 201-211.

- Mazón H.J., Gancedo J.M. y Gancedo C. (1982) *Eur.J.Biochem.* 127, 605-608.
- Mc Gowan E.B., Silhavy T.J. y Boos W. (1974) *Biochemistry.* 13, 993-999.
- Merkel G.J., Naider F. y Becker J.M. (1980) *Biochim.Biophys. Acta.* 595, 109-117.
- Miller J.H. y Reznikoff W.S. (1978) (editores) *The Operon*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor.
- Mitchell P. (1963) en *The Structure and Functions of Membranes and Surfaces of Cells* (Bell D.J. y Grant J.K. editores) Cambridge University Press. Londres p. 142.
- Mitchell P. (1972) *J.Bioenerg.* 3, 5-24.
- Müller N., Heine H.G. y Boos W. (1982) *Mol.Gen.Genet.* 185, 473-480.
- Monod J. (1956) *H.Ford Hospital Intern.Symp.* (Gacbler O.H. editor) Acad.Press. N.Y. Inc. Nueva York p.7.
- Nakae T. (1975) *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 64, 1224-1230.
- Neu H.C. y Heppel L.A. (1966) *J.Biol.Chem.* 240, 3685-3692.
- Newey H. y Smith D.N. (1964) *Nature.* 202, 400-404.
- Nishimura H., Sampuku K. e Iwashima A. (1983) *J.Bacteriol.* 150, 960-962.
- Ohnishi T. (1970) *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 41, 344-352.
- Opekarova M., Kotyk A., Horak J. y Kholodenko V.P. (1975) *Eur.J.Biochem.* 59, 373-376.
- Ohta N., Galsworthy P.R. Pardee A.B. (1971) *J.Bacteriol.* 105, 1053-1062.
- Oshumi Y. y Anraku Y. (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 2079-2081.
- Oxender D.L. (1972) *Annu.Rev.Biochem.* 41, 777-814.
- Oxender D.L., Anterson J.J., Daniels, C.J., Landick R., Gunsalus R.P., Zurawski G., Selker E. y Yanofsky C. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 77, 1412-1416.
- Panek A. (1962) *Arch.Biochem.Biophys.* 98, 349-355.
- Panek A. (1963) *Arch.Biochem.Biophys.* 100, 422-425.
- Plastow G.S. y Holland I.B. (1979) *Biochim.Biophys.Res. Commun.* 90, 1007-1014.

- Plate C.A. y Smit J.L. (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 12974-12980.
- Postma P.W. y Roseman S. (1976) *Biochim.Biophys.Acta.* 457, 213-257.
- Postma P.W. (1981) *J.Bacteriol.* 147, 382-389.
- Pugsley A.P. y Reeves P. (1977) *J.Bacteriol.* 130, 26-36.
- Quijcho F.A., Meador W.E. y Pflugrath J.W. (1979) *J.Mol.Biol.* 133, 181-184.
- Ramos E.H., Bongioanni L.C. y Stoppani A.O.M. (1969) *Biochim. Biophys.Acta.* 177, 671-673.
- Ramos E.H., Bongioanni L.C., Claisse M.L. y Stoppani A.O.M. (1975) *Biochim.Biophys.Acta.* 394, 470-481.
- Ramos E.H., Bongioanni L.C., Cuesta Casado M.C. y Stoppani A.O.M. (1977) *Biochim.Biophys.Acta.* 467, 220-237.
- Ramos E.H., Bongioanni L.C. y Stoppani A.O.M. (1980) *Biochim. Biophys.Acta.* 599, 214-231.
- Ramos E.H., Bongioanni L.C., Wainer S.R. y Stoppani A.O.M. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* 731, 361-372.
- Ramos S., Schuldiner S. y Kaback H.R. (1976) *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1892-1896.
- Ramos S. y Kaback H.R. (1977) *Biochemistry.* 16, 848-853.
- Ramos S. y Kaback H.R. (1977a) *Biochemistry.* 16, 854-859.
- Rickenberg H.V., Cohen G.N., Buttin G. y Monod J. (1956) *Ann. Inst. Pasteur.* 91, 829-857.
- Robertson D.E., Kroon P.A. y Ho C. (1977) *Biochemistry.* 16, 1443-1451.
- Robertson D.E., Kaczorowski G.J., García M.L. y Kaback H.R. (1980) *Biochemistry.* 19, 5692-5702.
- Robillard G.R. y Konings W.N. (1982) *Eur.J.Biochem.* 127, 597-604.
- Robillard G.R. y Lageveen R.G. (1983) en *Mobility and Recognition in Cell Biology* (Sund-Veegeer editores) Walter de Gruyter y Co. Berlín, Nueva York. pp 449-470.
- Roche B. y Azoulay E. (1969) *Eur.J.Biochem.* 8, 426-434.
- Roomans G.M. y Borst-Pawels G.W.F.H. (1979) *Biochem.J.* 178, 521-530.
- Roomans G.M., Kuypers G.A.J., Theuvsnet A.P.R. y Borst-Pawels G.W.F.H. (1979) *Biochim.Biophys.Acta.* 551, 197-201.

- Roon R.J., Larimore F. y Levi J.S. (1975) *J.Bacteriol.* 124, 325-328.
- Roseman S. (1964) *J.Gen.Physiol.* 9, 1385-1405.
- Roseman S. (1964) en *The Molecular Basis of Biological Transport* (Woesner J.F.Jr. y Huijing F. editores) Academic Press, pp 181-218.
- Roseman S., Weigel N., Waygood E.B., Kukuruzinska M.A. y Nakazawa A. (1982) *J.Biol.Chem.* 257, 14461-14569.
- Rosenberg H., Gerdes R.G. y Chegwidde K. (1977) *J.Bacteriol.* 131, 505-511.
- Rosenberg T. y Wilbrandt W. (1952) *Int.Rev.Cytol.* 1, 65-70.
- Rotman B., Ganesan A.K. y Guzman R. (1968) *J.Mol.Biol.* 36, 247-260.
- Rottemberg H. (1979) *Methods Enzymol.* 55, 547-569.
- Rudnick G., Schuldiner S. y Kaback H.R. (1976) *Biochemistry.* 15, 5126-5131.
- Rytka J. (1975) *J.Bacteriol.* 121, 562-570.
- Saier M.H. (1977) *Bacteriol.Rev.* 41, 856-871.
- Sanno Y., Wilson T.H. y Lin E.C.C. (1968) *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 32, 344-349.
- Saunders S.J. y Isselbacher K.J. (1965) *Biochim.Biophys.Acta.* 102, 397-401.
- Scarborough G.A. (1977) *Arch.Biochem.Biophys.* 180, 384-393.
- Schuldiner S., Kung H. y Kaback H.R. (1975) *J.Biol.Chem.* 250, 3679-3682.
- Schuldiner S., Weil R. y Kaback H.R. (1976) *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 73, 109-112.
- Schweizer H., Argast M. y Boos W. (1982) *J.Bacteriol.* 150, 1154-1163.
- Schwencke J., Farías G. y Rojas M. (1971) *J.Biochem.* 21, 137-142.
- Seaston A., Inkson C. y Eddy A.A. (1973) *Biochem.J.* 134, 1031-1043.

- Seaston A., Carr G., y Eddy A.A. (1976) *Biochem.J.* 154, 669-676.
- Serrano R. y De la Fuente G. (1974) *Mol. and Cell. Biochem.* 5, 161-165.
- Serrano R. (1977) *Eur.J.Biochem.* 80, 97-101.
- Serrano R. (1978) *Mol.Cell.Biochem.* 22, 51-63.
- Serrano R. (1980) *Eur.J.Biochem.* 105, 419-427.
- Serrano R. (1983) *FEBS Lett.* 156, 11-14.
- Shuman H.A., Silhavy T.J. y Beckwith J. (1980) *J.Biol.Chem.* 255, 168-174.
- Shuman H.A. y Silhavy T.J. (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 560-562.
- Shuman H.A. (1982) *J.Biol.Chem.* 257, 5455-5461.
- Sigler K., Knotková A. y Janáček K. (1980) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7, 371-375.
- Silhavy T.J., Ferenci T. y Boos W. (1978) en *Bacterial Transport* (Rosen B.P. editor) Marcel Dekker, New York pp 127-169.
- Singer J.J. (1975) en *Cell Membranes* (Weissman y Clairbone editores) H.P.Pub. Co. N.Y. p. 35.
- Slavik J. y Kotyk A. (1984) *Biochim.Biophys.Acta.* 766, 679-684.
- Slayman C.L. y Slayman C.W. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 71, 1935-1940.
- Sols A. (1967) en *Aspects in Yeast Metabolism* (Mills A.K. y Krebs H. editores) Blackwell, Oxford p.47.
- Stoppani A.O.M. y Ramos E.H. (1964) *Arch.Biochim.Biophys.* 105, 470-482.
- Sumrada R. y Cooper T.G. (1977) *J.Bacteriol.* 115, 284-289.
- Surdin Y., Sly W., Sire J., Bordes A.M. y De Robichon-Szulmajster H. (1965) *Biochim.Biophys.Acta* 107, 546-566.
- Szmecman S., Schwartz M., Silhavy T.J. y Boos W. (1976) *Eur. J.Biochem.* 65, 13-19.
- Takadera T. y Mohri T. (1982) *Biochim.Biophys.Acta.* 691, 293-299.

- Taylor E.S. (1947) J.Gen.Microbiol. 1, 86-93.
- Taylor E.S. (1949) J.Gen.Microbiol. 3, 211-219.
- Teather R.M., Hamelin O., Schwarz H. y Overath P. (1977) Biochim.Biophys.Acta. 467, 386-395.
- Teather R.M., Müller-Hill B., Abrutsch V., Aichele G. y Overath P. (1978) Mol.Gen.Genet. 159, 239-248.
- Theuvsen A.P.R. y Bindels R.J.M. (1980) Biochim.Biophys. Acta. 599, 587-595.
- Toci R., Belaich A. y Belaich J.P. (1980) J.Biol.Chem. 255, 4603-4606.
- Ureck K., Dürr M., Boller Th., Wiemken A. y Schwencke J. (1978) Arch.Microbiol. 116, 275-278.
- Vacata V., Kotyk A. y Sigler K. (1981) Biochim.Biophys.Acta. 643, 265-268.
- Van Den Broek P.J.A., Christianse K. y Van Steveninck J. (1982) Biochim.Biophys.Acta. 692, 231-237.
- Van Den Broek P.J.A. y Van Steveninck J. (1983) Biochim. Biophys.Acta. 722, 102-106.
- Van Steveninck J. (1972) Biochim.Biophys.Acta. 274, 575-580.
- Vorisek J. (1972) Folia Microbiologica. 18, 17-23.
- Wainer R.S. (1985) Tesis de Doctorado, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
- Weiner J.H. y Heppel L.A. (1971) J.Biol.Chem. 246, 6933-6941.
- West I.C. (1980) Biochim.Soc.Trans. 8, 706-707.
- Wiemken A. y Dürr M. (1974) Arch.Microbiol. 101, 45-50.
- Wikerham L.J. (1951) U.S. Dep.Agr.Tech.Bull. 1029.
- Wilson T.H. (1962) Intestinal absorption. Saunders Co, Philadelphia, Pa., p 263.
- Wiseman G. (1955) J.Physiol. 127, 414-417.
- Woodward J.R. y Cirillo V.P. (1977) J.Bacteriol. 130, 714-723.
- Woodward J.R. y Kornberg H.L. (1980) Biochem.J. 192, 659-665.
- Yariv J., Calb A.J. y Yariv M. (1972) FEBS Lett 27, 27-29.

Young J.D. (1980) Biochim.Biophys.Acta. 602, 661-672